INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Supplemento das Memorias
No. 9 31 de Julho de 1929

Summario:

Aragão, Drs. H. de Beaurepaire, e Costa Lima, A. da. Sobre a infecção do M. RHESUS pela deposição de fezes de mosquitos infectados sobre a pelle ou na conjunctiva ocular integras 133

Aragão, Drs. H. de Beaurepaire, e Costa Lima, A. da. Sobre o tempo necessario para que Stegomyias infectados excretem fezes virulentas 139

Ozorio de Almeida, Dr. Miguel. Contribuição ao estudo experimental da physiologia pathologica do "mal de engasgo" 146

Xavier, Dr. Antonio Augusto. Sobre os effeitos das variações da concentração osmotica do liquido de perfusão na technica de LAEWEN-TRENDELENBURG 152

Vellard, Dr. J. Acções phylacticas não especificas em relação aos venenos ophidicos. Tratamento auxiliar dos accidentes ophidicos 156

Fontes, Dr. A. Da heredo-infecção na tuberculose 168

Aragão, Dr. H. de Beaurepaire. Infecção do AEDES ÆGYPTI macho e possibilidade da propagação da febre amarella de STEGOMYIA a STEGOMYIA sem passagem pelo homem 190

Martins, Drs. Thales, and Rocha e Silva, A. The seminal vesicles of the castrated mouse, test for the testicular hormones 196

Homenagem á memoria de OSWALDO CRUZ 200

O supplemento das Memorias destina-se á publicação immediata das pesquizas realizadas no Instituto Oswaldo Cruz.

RIO DE JANEIRO
Typ. do INSTITUTO OSWALDO CRUZ
1929

Sobre a infecção do M. RHESUS pela deposição de fezes de mosquitos infectados sobre a pelle ou na conjunctiva ocular integras (1).

Pelos Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e A. da COSTA LIMA.

Proseguindo no plano de experiencias que vimos emprehendendo, relativas á infecção do *Macacus rhesus* pelas fezes de mosquitos infectados, procurámos verificar se a diluição de fezes, obtida segundo a technica descripta no nosso trabalho anterior (2), poderia tambem infectar o *rhesus*, quando deposta sobre a pelle ou na conjunctiva ocular, apparentemente sem qualquer solução de continuidade. Escolhemos para isso dois macacos, depois de termos verificado, com o auxilio de uma lente binocular, a integridade das regiões que iam receber o liquido infectante.

No primeiro, *rhesus* nº. 427, instillámos algumas gottas desse liquido numa das conjunctivas e no outro, *rhesus* nº. 428, deixámos cahir a outra parte do liquido sobre o tegumento intacto da região inguinal, sem arrancamento ou raspagem dos pêlos dessa região.

Fizemos a diluição empregando excreta de 9 mosquitos infectados no *rhesus* nº. 373, a 18 de abril, colhidas pouco depois daquelles terem picado uma cobaya sã.

Ambas as experiencias foram iniciadas a 21 de maio.

EXPERIENCIA 1. *M. rhesus* nº. 427. Temperatura: 38º,8.

Nos 2 dias que se seguiram e até o dia 28 a temperatura não foi além de 39º,8. A 29, porém, ascendeu a 40º,3, sendo o macaco sangrado no coração e o sangue inoculado no *rhesus* nº. 443. A 30 baixou a 40º,1 e a 31 a 39º. D'esse dia em deante houve ligeiras fluctuações thermicas em torno de 39º. A 4 a temperatura baixou a 37º,8, sendo então o macaco sacrificado.

As visceras apresentavam-se como nos casos de febre amarella. Todavia o exame histo-pathologico mostrou o seguinte: arranjo das traves conservado; infiltração gordurosa periporta. Não havia inclusões nucleares, nem necrose das cellulas hepaticas.

EXPERIENCIA 2. *M. rhesus* nº. 443. Inoculado a 29 de maio com 5 cc. de sangue retirado do *rhesus* n. 427. Temperatura 39º,2.

A 2 de Junho, ascendeu a 39º,9, a 3 a 40º,7 e, á tarde do mesmo dia, a 41º. A 4 baixou a 37º. A's 15 horas o macaco foi sacrificado. Lesões macroscopicas typicas.

---

(1) Entregue para publicação em 16 de Julho de 1929.

(2) ARAGÃO, Dr. H. BEAUREPAIRE e COSTA LIMA, Dr. A. da.—Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de mosquitos infectados. Apresentado á Sociedade Brasileira de Biologia, em sessão de 29 de Maio de 1929 e publicado no *Brasil-Medico*, 1929, XLIII, 24, 15 de Junho, 669-671 e no *Supplemento das Memorias*, Instituto Oswaldo Cruz, 8, 22 de Junho de 1929, 101-108, 2 figs.

O exame histo-pathologico do figado revelou: inclusões nucleares, extensa necrose e degeneração gordurosa das cellulas hepaticas. Fócos de infiltração por polymorpho-nucleares.

EXPERIENCIA 3. *M. rhesus* nº. 428, sobre cujo tegumento deixámos a referida diluição cerca de meia hora, soltando-o depois na gaiola. Nos dias seguintes e até o dia 27, apresentou temperaturas ou superiores de alguns decimos, ou pouco inferiores a 39º. A 28 a temperatura subio a 40º,3, descendo, no dia seguinte, a 40º, sendo então o macaco sangrado e o sangue inoculado no *rhesus* nº. 445.

A 30, pela manhã, encontrámos o macaco morto. As visceras apresentavam o aspecto typico que se observa nos casos de febre amarella, notando-se abundante hemorrhagia no estomago. O exame histo-pathologico do figado confirmou essa verificação, notando o Dr. M. TORRES o seguinte: desarranjo das traves, intensa necrose, degeneração gordurosa das cellulas do figado e inclusões nucleares. Congestão.

EXPERIENCIA 4. *M. rhesus* nº. 445. Inoculado a 29 de Maio com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* nº. 428. Temperatura no inicio da experiencia: 39º,3. No dia seguinte 39º,6 e a 31, 39º,7. A 1º de Junho a temperatura ascendeu a 40º,5. No dia immediato, isto é, 3 dias depois da inoculação, encontrámos o macaco morto na gaiola, sendo autopsiado tardiamente.

O exame histo-pathologico revelou: "inclusões nucleares pouco numerosas nas cellulas hepaticas, que apresentavam degeneração parenchymatosa. A necrose das cellulas do figado não poude ser devidamente apreciada" (TORRES).

Embora as experiencias acima demonstrem claramente que um ataque de febre amarella pode ser obtido no *rhesus* pela simples deposição de fezes infectantes na conjunctiva e na pelle, nós considerámos necessario repetir aquella que se referia a esse ultimo modo de transmissão.

Com esse objectivo foram usados 2 macacos, nº. 448 para ser infectado pela picada através de uma flanella e nº. 449 para ser infectado pela simples deposição de fezes sobre a pelle intacta.

EXPERIENCIA 5. *M. rhesus* nº. 449. Sobre a pelle do pescoço deste macaco foram depositadas, no dia 3 de Junho á tarde, algumas gottas de uma diluição de excreta expellidos por 9 dos mosquitos usados na experiencia de controle nº. 7.

Sendo possivel que o macaco houvesse arranhado o ponto em que fora depositado o virus, examinamol-o, na manhã seguinte, e verificámos que a pelle estava absolutamente integra. A temperatura era de 39º2. Nos dias seguintes, até 7 de Jnnho, nenhuma elevação acima de 39º3. Neste dia a temperatura se elevou a 49º,1 e o animal foi sangrado no coração. No dia seguinte a temperatura foi de 40º, no dia 9 baixou a 39º,5 e assim se manteve por 2 dias. Nos dias 12 e 13 nova elevação a 40º,2, sendo o macaco de novo sangrado no coração. Até o dia 20 a temperatura se manteve entre 39º e 40º. No dia 21 a temperatura era de 39º,7 e para sabermos se este *rhesus* no. 449 estava immune foi elle injectado com 0,5 cc. de sangue contendo virus do *rhesus* nº. 476. Nos dias 22 e 23 a temperatura se elevou acima de 39º,5; no dia 24 subiu a 40º,3 e no dia 25 a 40º,9 para cahir a 38º,3 no dia 26. No dia 27 o macaco foi encontrado morto na gaiola.

A autopsia revelou lesões macroscopicas typicas e o exame histo-

pathologico do figado deu o seguinte resultado: "intensa degeneração gordurosa e discreta necrose das cellulas hepaticas. Numerosas inclusões nucleares especificas" (TORRES).

Surge aqui a questão de se saber si o *rhesus* nº. 449 estava infectado com o material de excreta depositado sobre a pelle ou o foi sómente pelo virus do *rhesus* nº. 476.

A experiencia subsequente vae nos tirar essa duvida.

EXPERIENCIA 6. *M. rhesus* nº. 467 foi injectado por via subcutanea em 14 de Junho com 1 cc. de uma mistura dos sangues do *rhesus* nº. 449 colhidos em 7, 12 e 13. Temperatura: 39º.

No dia 14 a temperatura do macaco era de 39º,4 e no dia 15 de 40º, temperatura essa que se manteve por 7 dias com pequenas oscillações.

No dia 23 de Junho a temperatura foi de 39º,8 e no dia seguinte cahiu a 38º,6. O macaco morreu durante a noite apresentando as visceras todas as apparencias de febre amarella. O exame histo-pathologico do figado mostrou extensa necrose das cellulas hepaticas, degeneração gordurosa, corpusculos intranucleares e congestão.

Esta experiencia demonstra que o *rhesus* nº. 449 estava de facto infectado com o virus da febre amarella anteriormente á inoculação do sangue do *rhesus* nº. 476, que o superinfectou.

EXPERIENCIA 7. *M. rhesus* nº. 448. Foi picado em 3 de Junho por 12 mosquitos (as dejecções de 9 destes mosquitos foram usadas na experiencia 5) que tinham picado 28 dias antes o *rhesus* infectado nº. 405. Temperatura 39º.

As primeiras elevações de temperatura foram pouco accentuadas até os dias 7 e 8 em que ella se elevou a 39º,9. Desta data até a 21 a temperatura, ora baixa, ora alta, não excedeu a 39º,9. No dia 21, estando o macaco com 39º,2 foi elle inoculado com 1 cc. de sangue do *rhesus* infectado nº. 476, não tendo o macaco apresentado nenhuma reacção em seguida a esta inoculação ao contrario do que aconteceu com o *rhesns* nº. 449, como já ficou anteriormente assignalado.

O resultado desta experiencia mostra a possibilidade de uma infecção benigna num *rhesus* que foi picado por 12 mosquitos que 28 dias antes tinham sugado um *rhesus* infectado.

Em vista dos resultados acima citados nós estamos convencidos que os excreta de mosquitos infectados, quando simplesmente collocados sobre a pelle integra, são sufficientes para produzir casos de febre amarella experimental no *Macacus rhesus*.

On the infection of M. RHESUS by contact of the uninjured skin and conjunctiva with the excreta of infected mosquitoes. (1)

By Dr. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO and Dr. A da COSTA LIMA

Continuing with our projected experiments on the infection of *M. rhesus* by excreta of infected mosquitoes, we have considered it advisable to test whether the dilution of that material, obtained by working according to the technique described in our previous paper (2), could also infect the monkey if put in contact with the skin or in the conjunctiva, without injuring the epithelium.

For this purpose we have chosen 2 monkeys and verified, with the aid of a binocular lens, that the parts intended for the experiments were quite intact.

The first *rhesus*, nº. 427, was tested by puting a few drops of the infecting dilution in one of the conjunctival sacs; in the other one, *rhesus* nº. 428, put also some drops of the same fluid in contact with the skin of the inguinal region, where they remained for about half an hour. The dilution was prepared with excreta of 9 mosquitoes which had bitten *rhesus* nº. 373 on 18th April and fed, at the moment of the experiment, on a guinea-pig.

Both experiments began on May 21, 1929.

EXPERIMENT 1. *M. rhesus* nº. 427. Temperature: 38º.8.

On the two following days and up to 28, the temperature did not exceed 39º.8. On the 29th, however, the temperature had risen to 40º.3; the monkey was then bled and its blood injected into *rhesus* nº. 443. On the 30th the temperature fell to 40º.1 and to 39º on the 31st. From this date forward it showed slight fluctuations near 39º. On June 5, the temperature had fallen to 37º.8 when the monkey was killed.

The autopsy showed the viscera as in yellow fever cases; therefore, the histo-pathological examination of the liver, made by Dr. TORRES revealed: the outlines of the liver cells preserved; fatty infiltration arround the portal veins; neither intra-nuclear bodies, nor necrosis of the liver cells.

EXPERIMENT 2. *M. rhesus* nº. 443. Inoculated on May 29 with 0.5 cc. of blood taken from *rhesus* nº. 427. Temperature: 39º.2.

June 2, its temperature was 39º.9, on the following day 40º.7 in the morning and 41º on the afternoon. On June 4, the temperature had fallen to 37º. At 3 p. m., the temperature was 35º, when the monkey was killed.

---

(1) Received for publication July 16, 1929.

(2) ARAGÃO, Dr. H. de BEAUREPAIRE e COSTA LIMA, Dr. A. da—Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de mosquitoes infectados. Red before the Sociedade Brasileira de Biologia, May 29, 1929. Published in *Brasil-Medico*, 1929, XLIII, 25, June 15, 669-671 and also in *Supplemento das Memorias* of the Instituto Oswaldo Cruz, 8, June 22, 1929, 101-108, 2 figs.

The histo-pathological examination of the liver revealed: acidophile intra-nuclear bodies, extensive necrosis and fatty degeneration of the liver cells. Foci of infiltration by polymorphonucleated leucocytes.

EXPERIMENT 3. *M. rhesus* 428, whose skin was in contact for nearly half an hour with the dilution of excreta, was set at liberty in its cage.

On the following days and until the 27th May it showed fluctuations of temperature either somewhat above or a little below 39º. On the 28th the temperature had risen to 40º.3, falling the next day to 40º. The monkey was then bled and the blood used for inoculating *rhesus* nº. 445. On the 30th, in the morning, it was found dead in the cage.

The viscera showed the typical aspect observed in yellow fever and the stomach was almost filled with black material.

The histo-pathological examination of the liver showed disarrangement of the columns of hepatic cells, with extensive necrosis and fatty degeneration of the hepatic cells; intranuclear bodies. Congestion,

EXPERIMENT 4. *M. rhesus* nº. 445. Injected on May 29, with 0.5 of blood taken from the *rhesus* nº. 428. Temperature 39º.3. On the following day 38º.6; on the 31st: 39º.7. On June 1, the temperature had risen to 40º.5. On the next day, the third day after the monkey had been inoculated, we found it dead in the cage. It was autopsied too late.

The histo-pathological examination revealed: nuclear inclusions not abundant. The liver cells showed parenchymatous degeneration. Dr. TORRES could not perfectly observe the necrosis of those cells.

Though the experiments above described conclusively demonstrate that an attack of yellow fever may be induced in the healthy *rhesus* by simple contact of infected feces with conjunctiva or uninjured skin, we have considered it advisable to repeat the experiment relative to the last mentioned manner of transmission.

For this purpose we used 2 monkeys: nº. 449, for beeing infected, through the intact skin, by yellow fever virus contained in excreta and nº. 448, for beeing infected by the bite of the mosquitoes that had expelled such excreta.

EXPERIMENT 5. *M. rhesus* nº. 449. Received on the afternoon of June 3, on the skin of the throat, some drops of a dilution of excreta, expelled by 9 of the mosquitoes used in the control experiment nº. 7.

On the morning of the following day, as it was possible that the monkey had scratched itself, we examined again the contaminated region of the skin, having verified its integrity.

Temperature: 39º.2. On the first days following contamination the record of temperature showed no rise above 39º.3, till June 7 when the temperature was 40º.1. The monkey was then bled. On the next day temperature was 40º, and 39º.5 on the 9th. This temperature was maintained for the two subsequent days. On the 12th and 13th a new rise of temperature to 40º.2. By that occasion the monkey was bled again. From that date until the 18th the temperature varied from 39º to 40º, this temperature being again observed on the 19th and 20th.

On June 21 (temperature 39º.7), the monkey was given a subcutaneous injection of 0.5 cc. of blood obtained from infected *rhesus* nº. 476.

On the two following days the temperature did not exceed 39o.5. On the 24th again the temperature rose to 40o.3 and on the 25th to 40o.9. On the 26th, at noon, it sunk to 38o.3. On the 27th the monkey was found dead in its cage.

The histo-pathological examination of the liver revealed: "extensive fatty degeneration and slight necrosis of liver cells. Many hepatic cells show intranuclear bodies" (TORRES).

The question here naturally arises: the monkey was already infected when it was reinoculated with infected blood on the 21st June, or it became infected by that blood? It was solved by the subsequent experiment.

EXPERIMENT 6. *M. rhesus* nº. 467, on June 13th, injected subcutaneously with 1 cc. of blood, taken, on the 7th, 12th and 13th, from *rhesus* nº. 449. Temperature 39º.

On June 14, 39o.4. On the 15th, 40º; this temperature was maintained for the 7 subsequent days at about the same degree or with small fluctuations until June 23rd. On this day, the temperature had fallen to 39o.8. On the next day it sunk to 38o.6, and the monkey died during the night.

The histo-pathological examination of the liver showed: "extensive necrosis and fatty degeneration of the liver cells; intranuclear bodies; congestion" (TORRES).

EXPERIMENT 7. *M. rhesus* nº. 448. Was bitten on June 3 by 12 mosquitoes (the excreta of 9 of these mosquitoes were used in experiment 5) that had 28 days previously bitten infected *rhesus* nº. 405. Temperature 39º.

The first rise of temperature, wich was somewhat fluctuant in character, did not reach its height until June 7th or 8th, when the temperature was 39o.9. From that date until 21st the temperature, always somewhat fluctuant, did not exceed 39o.9. On the 21st (temperature 39o.2) the monkey was inoculated subcutaneously with 0.5 cc. of blood of the *rhesus* 476, without showing any signs of infection.

The result of this experiment shows the occurrance of a mild case of yellow fever produced by the bite of 12 mosquitoes that have fed on an infected monkey 28 days previously.

In the light of these results we feel convinced that excreta of infected mosquitoes, when simply put in contact with the uninjured skin, are sufficient to produce cases of yellow fever.

Sobre o tempo necessario para que Stegomyias infectados excretem fezes virulentas (1)

Pelos Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e A. da COSTA LIMA

Tendo em trabalhos anteriores demonstrado a infecciosidade dos exc eta de mosquitos cuja picada era egualmente infectante procurámos em seguida verificar qual o resultado que seria obtido com material de mosquitos com menos de 9 dias de infecção, que é o minimo demonstrado necessario para a transmissão pela picada.

As experiencias nesse sentido feitas, embora ainda não tenham dado o prazo minimo necessario á transmissão pelas fezes, demonstram no emtanto que pelo menos 5 dias após a picada ellas já são infectantes. Isto nós verificámos em 2 casos e em outro foi igualmente possivel obter a infecção com excreta do 7º dia. A seguir vamos tratar dessas experiencias e de outras feitas com o fim de confirmar e completar esses resultados.

EXPERIENCIA 1. *M. rhesus* nº. 434. Temperatura 39º. Foi inoculado em 25 de Maio com uma emulsão de excreta de 6 mosquitos que foram alimentados 5 dias antes com sangue do *rhesus* nº. 422 quando apresentava 40º de temperatura. Com o fim de usar excreta frescos no momento da experiencia os mosquitos foram alimentados em uma cobaya. Nos 4 dias seguintes temperatura normal. No dia 30 de Maio temperatura 39º,9 para cahir no dia seguinte a 38º,8. O *rhesus* foi sangrado no dia 31 de Maio e o sangue inoculado no *rhesus* nº 447. A temperatura do *rhesus* nº. 434 se manteve proxima á normal dahi em diante. No dia 12 de Junho o *rhesus* foi inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* infectado 464, cuja temperatura na occasião era de 39º,9. Seis dias depois a temperatura se elevou a 40º para cahir na normal nos dias segnintes. No dia 29 de Junho inoculámos este macaco com 1 cc. de sangue do *rhesus* infectado 480. A primeira elevação thermica foi observada em 4 de Julho (40º,1). No dia 5 o macaco teve 40º,9 de febre. No dia 6—40º,5; no dia 8 ás 11 horas da manhã o animal foi morto.

Exame histologico do figado: "Extensa necrose e degeneração gordurosa das cellulas do figado. Inclusões nucleares" (TORRES).

A experiencia acima referida não provou que o *rhesus* estava infectado antes da inoculação do sangue. Acreditamos no emtanto que ha algumas razões para suppôr a occurrencia de uma infecção muito benigna no *rhesus* depois da inoculação com excreta. De facto, o resultado da experiencia seguinte parece confirmar essa suspeita.

EXPERIENCIA 2. *M. rhesus* nº. 447. Temperatura 38º,7. Foi injectado em 31 de Maio, por via subcutanea, com 0,5 cc. do sangue do *rhesus* nº. 434. Este macaco mostrou febre sómente no dia 5 de Junho (39º,8). Desde esse dia até o dia 12 houve apenas algumas oscillações entre 39 e 39º,5. No

(1) Entregue para publicação em 20 de Julho de 1929.

dia 13 a temperatura se elevou a 39º,9 e no dia 14 a 40º,8; a 15—39º; a 16 —40º,5; a 17—39º,9; a 18—39º,2; a 19—39º,9; a 20—40º; a 21—39º,4. Neste dia o macaco foi inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* infectado 476 e não apresentou mais reacção alguma.

Este caso parece ter sido uma forma de caracter benigno porém mais severo que o do *rhesus* no. 434. Nós procurámos tambem provar o poder infectante dos mosquitos que serviram nesta experiencia e assim o *rhesus* nº. 457 foi inoculado no dia 8 de Junho com uma emulsão de 3 mosquitos que sobreviveram.

EXPERIENCIA 3. *M. rhesus* nº. 457. Inoculado como acima foi dito em 8 de Junho. Até o dia 14 nenhuma alteração notavel de temperatura. Nesse dia a temperatura cahiu a 37º,8 pela manhã, mas á tarde já tinha voltado á normal e assim se manteve até 21 de Junho, quando se elevou ligeiramente até 39º,7, depois voltando ao normal. No dia 24 de Junho o macaco foi inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* no. 476. No dia 28 a temperatura se elevou a 40º,2 e no dia seguinte cahiu a 38º,7. O animal estando enfraquecido foi sacrificado. O exame histo-pathologico do figado revelou: "Infiltração gordurosa. Congestão. Discreta necrose das cellulas do figado e inclusões nucleares especificas" (TORRES).

Alem dos mosquitos usados nesta experiencia nós conservámos ainda 5 mosquitos que tinham sido infectados ao mesmo tempo que os demais no macaco 422. No dia 15 de Junho, com 26 dias de infecção, elles picaram o *rhesus* nº. 473 e depois foram emulsionados em agua esterilisada e injectados por via subcutanea nesse mesmo macaco.

EXPERIENCIA 4. *M. rhesus* no. 473. Picado e inoculado com mosquitos como anteriormente foi dito. Em 19 de Junho observa-se que a temperatura se eleva a 40º,5 e mantem-se assim durante dous dias. No dia 22 o macaco é encontrado morto na gaiola. Lesões macroscopicas typicas. O exame histo-pathologico do figado revela: "Necrose e degeneração gordurosa das cellulas do figado, inclusões nucleares. Congestão" (TORRES).

O sangue do *rhesus* nº. 473 do dia 19, inoculado no dia 21 de Junho no *rhesus* no. 455, produz infecção amarillica neste animal.

EXPERIENCIA 5. *M. rhesus* nº. 455. Inoculado como acima ficou dito no dia 21 de Junho. Apparece a primeira elevação de temperatura (40º,1) no dia 27. No dia 28 o macaco apresenta 38º,9 e no dia 29—35º,8. Foi sacrificado. Lesões macroscopicas typicas. O exame histologico revela: "Necrose e degeneração gordurosa das cellulas do figado e inclusões nucleares" (TORRES).

Embora, por qualquer das experiencias anteriores, não se possa responder ao assumpto em discussão, desejamos no emtanto chamar a attenção para os factos assignalados na experiencia 2 que consideramos como indicando que esse macaco estava infectado pelo sangue do animal que tinha sido injectado com os excreta dos mosquitos contaminados 5 dias antes. Nossas experiencias seguintes são absolutamente concludentes a esse respeito.

EXPERIENCIA 6. *M. rhesus* nº. 479. Este macaco recebeu em 25 de Junho por via subcutanea uma diluição de excreta de mosquitos que 5 dias antes tinham sido infectados no *rhesus* n. 476. Temperatura 38º,9. No dia 29 de junho, temperatura de 40º. Deste dia a 4 de Julho a temperatura

esteve sempre proxima a 40º,5. No dia 4 de Julho cahiu a 38º,7 e no dia seguinte o animal foi eecontrado morto na gaiola. Lesões macroscopicas typicas e o exame microscopico deu o seguinte resultado: "Congestão, degeneração gordurosa e necrose das cellulas do figado. Inclusões nucleares especificas" (TORRES).

EXPERIENCIA 7. *M. rhesus.* nº. 489. Foi inoculado em 29 de Junho com 1cc. de sangue do *rhesus* nº. 479, colhido nos dias 29 e 30 de Junho. Temperatura 39º,3. Este macaco teve uma infecção apyretica, como ás vezes acontece e no dia 6 de Julho foi encontrado cahido na gaiola e com 35º, sendo por isso sacrificado. Apresentava lesões macroscopicas e o figado, revelou ao exame histo-pathologico. "Congestão, degeneração gordurosa necrose das cellulas e muitas cellulas com inclusões nucleares" (TORRES).

EXPERIENCIA 8. *M. rhesus* no. 456. Foi inoculado no dia 8 de Junho com uma diluição de excreta de 2 mosquitos que tinham picado em 1º de Junho o *rhesus* nº. 445. A temperatura deste macaco não foi typica de febre amarella. Do dia 10 em deante a temperatura foi em geral alta sem modificação especial. Em 23 de Junho era de 40º. No dia seguinte baixou a 39º,5. Neste dia o macaco foi inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* no. 476. No dia seguinte o macaco parecia muito doente e nós o matámos. Lesões macroscopicas typicas e o exame histo-pathologico revelou: "Necrose extensa e degeneração gordurosa das cellulas do figado, inclusões nucleares abundantes, congestão e agglomerações de leucocytos polymorphonucleares" (TORRES).

Certamente estas lesões já estavam formadas antes da inoculação do material infectante do *rhesus* nº. 476.

Os 2 mosquitos desta experiencia, que ainda estavam vivos 13 dias mais tarde, foram mortos e triturados em agua esterilisada. A emulsão delles foi inoculada em um *rhesus* nº. 469, que tambem foi antes picado pelos mesmos 2 mosquitos.

EXPERIENCIA 9. *M. rhesus* no. 469. Este macaco foi inoculado como anteriormente ficou dito no dia 14 de Junho. Do dia seguinte em diante a temperatura se elevou a 40º e a 18 attingio 41º,1. No dia seguinte pela manhã a temperatura havia cahido consideravelmente sendo então o macaco sacrificado. Lesões macroscopicas typicas e o exame histo-pathologico revelou: "Necrose intensa e degeneração gordurosa das cellulas hepaticas, inclusões intranucleares" (TORRES).

As experiencias acima demonstram que é possivel obter-se a infecção do *rhesus* com excreta de mosquitos tendo picado sómente 7 e até mesmo 5 dias antes. Ellas ainda uma vez confirmam o modo de contaminação pelos excreta e, considerando as experiencias de transmissão pela simples deposição de excreta sobre a pelle, mostram que talvez esse processo se possa egualmente produzir com mosquitos mais recentemente infectados.

About the time required by the infected Stegomyia to expell virulent excreta (1)

By Dr. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO and Dr. A. da COSTA LIMA

Having shown the infeetious nature of the excreta of mosquitoes already infective by its bites, it remained to inquire whether such action would also be observed by using excreta of mosquitoes, that had bitten a yellow fever monkey, before attaining the 9th day after contamination, viz. the period considered by the authors as a minimum for the bites to become infective.

Accordingly we have undertaken some experiments in order to obtain data regarding the infection before that period. Though, by these experiments, we are not yet able to inform exactly in which day after the contamination the mosquito faeces become infective, they so far prove that the yellow fever virus may be present in the excreta at least 5 days after the mosquito has fed on an infected monkey. This we observed in two experiments and also verified in another case the infection produced by excreta of mosquitoes that had 7 days previously bitten an infected monkey. We give now brief notes of these experiments and of others performed in order to confirm the results we obtained.

EXPERIMENT 1. *M. rhesus* nº. 434. Temperature 39º. Received on May 25 a subcutaneous injection of a dilution of excreta of 6 mosquitoes that had been fed 5 days previously on blood of the infected *rhesus* nº. 422, when the temperature of which hade risen above 40º. In order to use fresh excreta at the time of the experiment the mosquitoes were then fed on a guinea-pig.

On the 4 following days the temperature remained normal. On May 30 it had risen to 39º.9, falling the next day to 38º.8. The monkey was then bled and its blood inoculated, on May 31, in *rhesus* nº. 447. From that date forward the temperature has fluctuated, either a little above or a little bellow 39º. On June 12 we injected the monkey subcutaneously with 0.5 cc. of blood taken from infected *rhesus* 464; the temperature of that monkey was then 39º.9. Six days latter we observed a more marked rise of fever (40º), the temperature falling to normal on the following days. On June 29 we reinoculated the monkey with 1 cc. of blood taken from infected *rhesus* nº. 480. The first rise of temperature was observed on July 4 (40º.1). On the next day the temperature was 40º.9; on 6th—40º.5; on 7th — 40º. On 8th, at 11 a. m., it was killed.

The histo-pathological examination of the liver revealed: "Extensive fatty degeneration and necrosis of liver cells. Nuclear inclusions" (TORRES).

The reported experiment does not prove that the monkey was infected before the inoculations of blood. We believe, however, that there is

(1) Received for publication July 20, 1929.

some reason to suppose the occurence of a mild infection after the inoculation of excreta. In fact, the result which we have obtained in the next experiment seems to confirm that suspicion.

EXPERIMENT 2. *M. rhesus* no. 447. Temperature 38o.7. Injected subcutaneously, on May 31st, with 0.5 cc. of blood withdrawn from *rhesus* no. 434. This monkey showed a rise of temperature only on June 5 (39o.8). From this day until the 12th there were slight fluctuations between 39o and 39o.5. On June 13 the temperature rose again to 39o.9; on the 14th to 40o.8. From this day until Jnne 21 we observed always temperatures over 39o: 15th: 39o.9; 16th: 40o.5; 17th: 39o.9; 18th: 48o.2; 19th: 39o.9; 20th: 40o; 21st: 39o.4. On this last day the monkey was inoculated subcutaneously with 0.5 cc. of blood of the infected monkey 476, without showing any reaction.

The case seems to be also of a mild character, though somewhat more severe than that of *rhesus* no. 434.

We also tried to prove the infective action of the mosquitoes used in experiment 1 by inoculating, on June 8, *rhesus* no. 457 with an emulsion of the bodies of 3 of the surviving insects, 19 days after they had been contaminated.

EXPERIMENT 3. *M. rhesus* no. 457. Inoculated, as above described, on June 8. This monkey did not show any marked rise of temperature, Therefore, on June 14, viz. on the sixth day after inoculation, the temperature dropped to 37o.8 early in the morning, but on the afternoon it had risen to 38o.5. The subsequent course was passed without marked accidents, although it had occured a slight rise of temperature (39o.7) on the 21st. On the 24th the monkey was injected subcutaneously with 5 cc. of blood withdrawn from the infected monkey 476. On the 28th the temperature rose to 40o.2 and on the next day nad sunk to 38o.7. The monkey was then killed. The histo-pathological examination of the liver revealed: "Fatty infiltration. Congestion. The fatty degeneration and the necrosis of liver cells are slight. Specific nuclear inclusions" (TORRES).

Besides the mosquitoes used in experiment 1 we have kept 5 specimens, also fed, at the same time, on infected monkey 422. These especimens were killed on June 15, viz. 26 days they had been contaminated and triturated in sterilized water. A few cc. of the emulsion thus prepared were injected subcutaneously into *rhesus* 473.

This monkey was previously bitten by the same mosquitoes.

EXPERIMENT 4. *M. rhesus* no. 473. Inoculated, on June 15, as above described. The first rise of temperature was observed on June 19 (40o.5) and it continued high on the two following days. On the 22nd, early in the morning, we found the monkey dead in its cage. The histo-pathological examination of the liver revealed: "Necrosis and fatty degeneration of liver cells. Nuclear inclusions. Congestion" (TORRES).

The blood of *rhesus* 473, withdrawn on June 19 and inoculated on June 21 into *rhesus* 455, reproduced the yellow fever lesions in this monkey.

EXPERIMENT 5. *M. rhesus* no. 455. Inoculated, on June 21, as above described. The first rise of temperature (40o.1) was observed on June 27; on the 28th—38o.9; on the 29th—35o.8, in the morning, when the monkey was killed. The histo-pathological lesions of the liver observed by Dr.

TORRES were: "Necrosis and fatty degeneration of liver cells. Specific nuclear inclusions".

If by an examination of the foregoing cases we cannot draw a sure conclusion to answer to the question here discussed, therefore, by recording them, we desire to invite special attention on the facts reported in experiment 2, which we consider as indicating the monkey was infected by the blood taken from the animal that was injected with excreta of mosquitoes contaminated 5 days previously. However our following experiment was undoubtedly conclusive on this point of view.

EXPERIMENT 6. *M. rhesus* nº. 479. Received on June 25 subcutaneously a dilution of excreta of two mosquitoes that had been contaminated on *rhesus* no. 476, 5 days previously. Temperature 38º.9. On June 29th: 40º. From this day until July 3 the temperature was high, near 40º.5 On the 4th July, it dropped to 38º.7. On the following day (5th) the monkey was found dead in the cage. The histo-pathological examination of the liver showed: "Congestion. Fatty degeneration and necrosis of liver cells. Specific nuclear inclusions" (TORRES).

EXPERIMENT 7. *M. rhesus* nº. 489. Inoculated on July 1 with 1 cc. of blood withdrawn from *rhesus* nº. 479 on the 29th and 30th June. Temperature 39º.3. This monkey did not show any rise of temperature, but on July 6, as the temperature had fallen to 35º, it was killed. The histo-pathological examination of the liver revealed: "Congestion. Fatty degeneration and numerous liver cells with nuclear inclusions" (TORRES).

We have tried also to infect *M. rhesus* by using mosquitoes that had been contaminated by feeding on infected monkey 7 days previously.

The possibility of that infection seems to have been determined by the following experiment.

EXPERIMENT 8. *M. rhesus* nº. 456. Was inoculated subcutaneously on June 8 with a dilution of excreta of 2 mosquitoes that had been fed on infected *rhesus* nº. 445, on June 1. The temperature record of this monkey was not of a typical case of yellow fever. From June 10 the temperature was high, almost without any marked change. On June 23 it was 40º. On the next day, on the afternoon, it was 39º.5. We then inoculated 0.5 cc. of blood withdrawn from infected *rhesus* nº. 476. On the next morning (June 25), as the monkey looked very weak, we killed it. The histo-pathological examination of the liver revealed: "Extensive necrosis and fatty degeneration of liver cells; nuclear inclusions very abundant. Congestion. Agglomeration of polymopho-nucleated leucocytes" (TORRES).

Certainly these lesions were produced before the inoculation of the infective blood.

The 2 mosquitoes used in the foregoing experiment were kept and 13 days later killed and triturated in sterilized water. This emulsion was injected subcutaneously into *rhesus* nº. 469. This monkey was also bitten by the same mosquitoes.

EXPERIMENT 9. *M. rhesus* no. 469. On June 14 was bitten and received 2 cc. of the emulsion of the 2 mosquitoes used in experiment 8. The height of the febrile paroxym was reached on the 18th, when the temperature was 41º.1. The monkey was killed in the 20th, in the morning, when the temperature was very low. The histo-pathological examination of

the liver showed: "Intense necrosis and fatty degeneration of liver cells. Specific nuclear inclusions" (TORRES).

As we have, for the first time, recorded cases in which yellow fever in *M. rhesus* followed the inoculation of infective excreta of mosquitoes contaminated 7 or even 5 days previously, and considering our previous verification of infection produced by contact of infective excreta with the uninjured skin, we believe that the observations here reported ought to call renewed attention not only to the mode of infection in general, but specially to the result that may follow the contamination of the skin by excreta of mosquitoes more recently infected.

Contribuição ao estudo experimental da physiologia pathologica do "mal de engasgo" (1)

Pelo Dr. MIGUEL OZORIO DE ALMEIDA.

Têm sido observados no Brasil, e especialmente em certas zonas ruraes, casos bastante numerosos de uma infecção caracterisada por perturbações mais ou menos profundas das funcções de deglutição. Estre as varias denominações por que se designa o quadro morbido prevaleceu a de "mal de engasgo".

O mal de engasgo foi, entre nós, objecto de numerosos estudos, esparsos sob a fórma de communicações a sociedades scientificas ou artigos de revistas medicas. Esses estudos se acham actualmente expostos de um modo bastante minucioso na these de doutoramento de S. Paulo do Dr. PARISI (2). Nós nos dispensamos pois, de qualquer historico e não nos estenderemos na descripção clinica.

Desde o inicio, a attenção dos clinicos se fixou nas alterações das funcções do esophago apresentadas pelos doentes e logo que foi possivel applicar ao exame desse orgão os methodos mais fecundos da investigação como o exame radiologico, os dados obtidos se tornaram muito mais precisos. O mal de engasgo se caracterisa radiologicamente por uma dilatação mais ou menos extensa e accentuada do esophago. Em muitos casos ha a formação nitida de uma bolsa onde ficam os alimentos, que não descem immediatamente para o estomago, ahi estacionando por algum tempo.

O catheterismo mostra que em varios casos não ha uma resistencia notavel do cardia á passagem dos alimentos, pois que sondas volumosas podem atravessar sem difficuldade a região do cardia e penetrar no estomago. Frequentemente os alimentos são regeitados totalmente ou em parte. Phenomenos de compressão, phenomenos á distancia e um estado de desnutrição que pode ir até á miseria physiologica e mesmo á morte completam o quadro clinico.

A pathogenia do mal de engasgo deu logar a muitas controversias. Muitos dos pesquizadores brasileiros que o estudaram procuraram estabelecer um nexo entre essa affecção e uma ou outra das doenças endemicas que mais ou menos intensamente existem no interior do Brasil (paludismo, doença de CHAGAS, etc.). Entretanto, os argumentos apresentados a favor de uma relação de causa a effeito entre uma dessas doenças e o mal de engasgo não foram até hoje de todo convincentes. A coexistencia do mal de engasgo e de uma dessas molestias parece ser simplesmente uma concomitancia nos mesmos individuos de doenças differentes.

(1) Communicação feita ao III. Congresso Brasileiro de Neurologia e Psychiatria. Julho de 1929.

(2) R. PARISI - Contribuição ao estudo do mal de engasgo e seu tratamento cirurgico. These de S. Paulo. 1925.

Não nos demoramos sobre as outras interpretações apresentadas (fechamento do esophago com consequente obliteração por acção do diaphragma, influencia da má alimentação, etc.). A nossa attenção foi exclusivamente voltada para o seguinte problema: seria possivel reproduzir experimentalmente em animaes um quadro morbido semelhante ao que caracterisa o mal de engasgo? Se positiva a solução desse problema, as vantagens para o estudo da physiologia pathologica dessa doença seriam evidentes.

Dadas as relações do esophago com os nervos pneumogastricos e conhecidos os resultados obtidos pelos physiologistas em experiencias sobre as alterações do tonus e do peristaltismo esophageano depois das secções desses nervos, a attenção de certos clinicos se voltou para esse lado. Uma observação celebre de KRAUS revelou em um caso de dilatação do esophago alterações accentuadas dos nervos pneumogastricos. O nervo esquerdo mostrava-se achatado com um desenvolvimento anormal de tecido conjunctivo vascularisado. Ao exame microscopico foi verificado estarem as fibras nervosas degeneradas em sua maioria, havendo apenas conservação de um pequeno numero em estado normal. O vago direito apresentava alterações do mesmo genero, comquanto menos accentuadas. A essas observações de KRAUS seguiram-se outras de HEYROWSKY, KELLING, GLAS, GERIMANOWITSCH, FRICKER, etc. D'ahi a idéa de procurar reproduzir experimentalmente a dilatação do esophago por secções dos pneumogastricos, operadas em niveis differentes. Essas experiencias, feitas por SINNHUBER, STARCK e outros deram resultados contradictorios. Entretanto HOFER em um trabalho longo e paciente chegou a resultados interessantes. PARISI transcreve em sua these as principaes experiencias de HOFER das quaes poude o auctor tirar, entre outras, as seguintes conclusões:

"1o. O nervo vago é, como se sabia, o nervo tonificante do esophago; sua resecção produz atonia de modo que desapparece a principio a peristaltica normal e que o obstaculo do cardia se torna insuperavel. Sua irritação faradica augmenta o tonus do esophago e, ao que parece, tambem a occlusão do cardia.

3o. A vagotomia, sob condições, produz similar absoluto á dilatação do esophago humano com cardioespasmo; com isto não queremos dizer que sómente uma affecção do vago pode produzir tal quadro morbido".

Resolvemos operar a vagotomia dupla em cães, conservando-os o mais tempo possivel, afim de poder formar opinião sobre este ponto tão controvertido. Nossas experiencias nos levaram á convicção de que a vagotomia dupla e total, comquanto fornecendo resultados interessantes, não permitte conclusões definitivas. Em primeiro logar, na quasi totalidade dos casos a sobrevida é reduzida (3). Por outro lado, as alterações profundas que se observam para o lado de outras funcções (circulação, respiração)

(3) Sabe-se que com precauções muito especiaes pode-se, em um ou outro caso, obter animaes que sobrevivam longamente á vagotomia dupla (PAVLOV e KATSCHKOWSKI, NIKOLAIDES, etc.). Essas experiencias são, porem, feitas em condições que prejudicam a boa observação das funcções do esophago, e alem disso, pela raridade dos resultados positivos, não podem servir de base para um methodo geral de pesquiza nesta questão.

difficultam a observação. Em nossas experiencias, os animaes, cuja sobrevida foi de poucos dias, recusavam o mais das vezes toda e qualquer alimentação. Foi-nos possivel, porem, verificar que o esophago se mostrava quasi completamente atonico. Em alguns casos, por occasião de esforços musculares violentos (movimentos de defesa ao serem seguros para a fixação na mesa de operações) os animaes mostravam periodos de extrema difficuldade respiratoria devida a uma compressão da trachéa pela bolsa esophageana dilatada e cheia de ar deglutido. Em um momento dado, se o ar contido na bolsa esophageana era expellido, o que se fazia com ruidos caracteristicos, a respiração se tornava livre e facil, mostrando apenas o rythmo lento e profundo, mas não dyspneico, geralmente observado nos cães vagotomisados. Todos os animaes eram tracheotomisados para evitar a penetração de particulas alimentares nas vias respiratorias. Em um caso houve accumulo de secreções mucosas na canula tracheal formando um obstaculo mechanico á respiração. Removido esse obstaculo, a respiração voltou ao seu typo habitual. Em todos os casos os animaes foram encontrados mortos, apresentando phenomenos de congestão e ás vezes edema para o lado dos pulmões, e uma grande bolsa esophageana dilatada por massa consideravel de ar.

O exame radiologico de um de nossos cães vagotomisados, não deu resultados muito animadores. Recusando-se o animal a comer o repasto de prova, procurou-se introduzir uma sonda no esophago. A operação não foi facil, pois essa quasi sempre se dirigia para a trachéa. Quando a sonda penetrou no esophago e se fez a introducção da pasta de bismutho, o animal teve nma syncope respiratoria, o que não permittiu continuar as observações.

Em resumo, comquanto fornecendo alguns resultados interessantes relativos á atonia e á ausencia de peristaltismo do esophago e aos phenomenos brutaes que dahi podem resultar (principalmente asphyxia ou dyspnéa por compressão da trachéa pela bolsa esophageana) na vagotomia dupla total as condições geraes do animal não são favoraveis a uma boa observação. Não nos foi possivel obter um quadro que apresentasse uma analogia estreita com o quadro morbido do mal de engasgo humano. Apenas alguns elementos subsidiarios foram aproveitados.

Passámos então a estudar o modo de reagir do esophago em animaes normaes e em animaes vagotomisados, quando se procura dilatal-o por injecções volumosas de agua ou de ar. Uma sonda era introduzida no orgão, de modo que sua extremidade se abrisse a meio percurso entre o pharynge e o estomago. O esophago era libertado em toda sua porção cervical que ficava accessivel á observação directa. Com uma seringa metallica de 100 c.c. podia-se, pela extremidade livre da sonda, fazer as injecções. No animal com os pneumogastricos intactos essas injecções dão logar a uma serie de ondas de contracção peristaltica que conduzem immediatamente o liquido ou o gaz para o estomago. Essas ondas são rythmicas e se succedem com alguns segundos de intervallo. O esophago não se deixa dilatar. Terminada a injecção, elle se esvasia immediatamente. Elle se apresenta, pois, em um verdadeiro estado de tonus que, segundo PALUGYAY (4) tem sido pouco estudado pelos auctores.

---

(4) J. PALUGYAY :—Schlucken in Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. de Bethe, Bergmann, Embden, Ellinger, Bd. III, pg. 357.

Quando se cortavam os nervos pneumogastricos no pescoço, as reacções do esophago se apresentavam de todo mudadas. A' medida que o liquido era injectado, observavam-se as contracções rythmicas, mas limitadas exclusivamente á primeira porção da região cervical; essas ondas de contracção não se transmittiam ao resto do esophago, que, inerte e atonico, se deixava dilatar até formar uma bolsa alongada, comprimindo a trachéa e os orgãos visinhos. A agua e o ar ficavam em grande parte no esophago sem serem conduzidas para o estomago. Está hoje demonstrado em Physiologia (KRONECKER, SCHREIBER, v. ESPEZEL, KAHN) que a parte superior do esophago cervical no cão é innervada por um ramo que se destaca do pneumogastrico acima do ganglio nodoso. A secção feita no meio do pescoço poupa assim esse ramo. Isso explica porque a primeira porção do esophago apresentava ainda ondas de contracção em nossas experiencias.

Poder-se-hia perguntar como as excitações mechanicas de compressão exercidas pela agua ou pelo ar injectados na parte media do esophago produzem ondas reflexas de peristaltismo. Isso pareceria em desaccordo com os dados classicos (HOLMER). Mas KAHN poude desde 1906 provar que é possivel provocar o peristaltismo do esophago pela introducção de corpos directamente no seu interior. MELTZER poude dissociar dous mechanismos reflexos que provocam o peristaltismo esophageano. Ao lado do mechanismo anteriormente admittido existe outro consistindo na producção de cadeias de reflexos, produzidos pela distensão do orgão. Cada ponto excitado provoca um reflexo local. Segundo MELTZER, a um peristaltismo *primario* se deve accrescentar um peristaltismo *secundario*. A essas duas fórmas de peristaltismo ainda accrescentou outra CANNON, dependente das fibras musculares lisas do esophago.

As experiencias por nós executadas acima relatadas vieram assim pôr bem em evidencia o modo de se comportar do esophago, quando privado de sua innervação normal pelos nervos pneumogastricos.

O problema pathologico, entretanto, ainda apresentaria depois disso muitos pontos obscuros. Não se poderia pensar, como effeito, em admittir uma suppressão completa das funcções vagaes nos doentes de mal de engasgo ou nos doentes portadores de uma dilatação esophageana de qualquer natureza. Nós nos perguntámos então quaes seriam os effeitos de uma lesão parcial dos nervos pneumogastricos. Nessa altura chegou-nos ás mãos o trabalho de CHICHIO TAMYIA e SHIGERU SANO (5) que tendo empregado uma technica differente da nossa chegam entretanto em muitos pontos a resultados analogos. Cabendo a esses experimantadores a prioridade dos resultados, é justo que exponhamos aqui summariamente em primeiro logar as suas conclusões. TAMYIA e SANO fizeram injecções de arsenico em glycerina (0,005 e 0,01 ccm. de solução a 50 p. 100) na bainha do vago-sympathico de cães. Puderam pelas verificações histologicas posteriores demonstrar que os nervos assim tratados apresentam alterações

(5) TAMYIA, CHICHIO, und SHIGERU SANO:—Experimentelle Studien über den Oesophagus. V. Roentgenologische Untersuchungen der expertmentellen Schluckbeschwerde und der Dilatation des Oesophagus beim Hunde; deren Vergleich mit indiopathische Oesophagusdilatation und ihre Pathogenese. Zeitschr. f. d. ges. experim. Medizin 1928, LXI, 627—650.

parciaes, de degeneração e atrophia que se estendem por todo o nervo. Essas alterações concordam com as lesões encontradas nas autopsias dos casos de KRAUS e HEYROWSKY. A operação foi em certos casos praticada em um só dos troncos do vago, e em outros nos dois. Os resultados são muito demonstrativos. Nos casos de lesão de um só dos pneumogastricos, foram notadas perturbações da passagem do repasto de prova atravéz do cardia. Essas perturbações eram reduzidas e não duradouras. O tonus e o peristaltismo do esophago não apresentavam perturbações apreciaveis. Os auctores concluem que a innervação dupla do esophago não é physiologicamente necessaria. A falta da innervação de um lado não produz modificações permanentes como atonia e perturbação da motilidade das paredes do esophago, dilatação, alterações definitivas da passagem do cardia.

Nos casos em que se procedeu á operação dos dois lados os principaes factos observados foram os seguintes: "24—48 horas após a operação o peristaltismo das paredes do esophago nas partes thoracica e subphrenica regride consideravelmente. Ao contrario do que se observa na secção total dos vagos, não falta elle completamente. . . A dilatação do lumen se installa 24—48 horas depois da operação. Essa dilatação cresce com o tempo, e não se limita só á parte inferior do esophago thoracico, onde a estagnação dos alimentos a reforça, mas tambem se estende ás partes superiores e inferiores. . . A dilatação do lumen se propaga até junto ao cardia, o que contrasta com os factos clinicos de dilatação idiopathica, nos quaes a dilatação o mais das vezes termina acima do hiato esophageano, achando-se a parte sub-phrenica do esophago junto com o cardia mais ou menos espasmodicamente contrahida. . . O esophago dilatado mostra-se na autopsia como um sacco atonico e inerte, cujas dimensões são, comparadas com as do cão normal, no minimo duas vezes maiores. . ."

Em nossas experiencias seguimos uma technica differente da de TAMYIA e SANO. Operavamos a secção total de um pneumogastrico e alguns dias depois a secção parcial do outro. Para isso, tomando o tronco nervoso, separavamos metade ou tres quartos das fibras que compõem o nervo e as cortavamos. Os animaes assim operados, manifestavam ao fim de 24 ou 48 horas todos os symptomas do mal de engasgo. Daremos aqui resumido o protocollo de uma das experiencias.

Cão. Secção do pneumogastrico direito em 2 de Outubro de 1928. A 24 do mesmo mez secção de metade do vago esquerdo. A partir de 26 o animal mostrava todos os symptomas do mal de engasgo. Dada a refeição comia com avidez. Ao fim de pouco tempo, porem, parava e depois de manifestações de grande afflicção regeitava os alimentos. No dia 29 foi examinado aos raios X, com o auxilio competente do Dr. EVANDRO CHAGAS. Dada uma mistura de leite e cytobario, que o animal deglutiu bem, foi collocado em pé sobre as patas trazeiras no apparelho. O liquido passára bem e se achava no estomago. Deu-se-lhe então uma nova refeição composta de carne impregnada de cytobario. Comeu bem a principio; mas pouco depois parou mostrando os symptomas caracteristicos da *entalação*. O exame radiologico mostrou então que os pedaços de carne se achavam todos no esophago, sem terem passado para o estomago. Antes de se ter podido tirar uma chapa, regeitou todos os alimentos. Renovou-se o repas-

to, com quantidade menor de alimentos, que foram guardados sem regeição. Aos raios X verificou-se novamente a estagnação da massa alimentar no esophago. Esse cão morreu na noite de 11 para 12 de Dezembro de 1928, um mez e meio depois da operação do segundo pneumogastrico. Apezar da avidez que sempre mostrava para os alimentos, as perturbações da deglutição impediram uma nutrição sufficiente. Pouco a pouco foi emmagrecendo, tendo chegado aos limites da miseria physiologica. So um pouco de leite que conseguia deglutir o mantinha em vida.

Um outro cão operado da mesma maneira em 24 de Setembro apresentava desde 27 o quadro morbido do mal de engasgo. Nesse dia, trazido ao laboratorio começou a comer com avidez. Ao fim de pouco tempo manifestaram-se as difficuldades da deglutição. Fazia esforços visiveis para engulir lançando bruscamente a cabeça para a frente e mostrando bruscos abalos do abdomen. A afflicção cresceu. Latia, corria, andava para traz. Assim permaneceu por mais de meia hora, até que regeitou os alimentos. Devemos tambem assignalar antes do vomito, uma enorme dilatação do abdomen, dando a impressão de serem as visceras recalcadas por uma contracção permanente do diaphragma. Neste animal os symptomas não se mantiveram sempre com a mesma intensidade como no primeiro caso. Foram regredindo e o mesmo cão serviu posteriormente para uma experiencia de secção dupla dos pneumogastricos.

Em resumo, com a secção total de um pneumogastrico e parcial de outro, se obtem no cão, um quadro clinico cujas manifestações se superpõem exactamente ás do quadro apresentados pelos individuos affectados de mal de engasgo. Sem querer entrar nas hypotheses que poderiam ser feitas para orientar as novas pesquizas no terreno da Pathologia, pensamos que esses resultados podem ser uteis para a elucidação dos problemas suscitados pela pathogenia dessa doença.

Sobre os effeitos das variações da concentração osmotica do liquido de perfusão na technica de LAEWEN-TRENDELENBURG

Pelo Dr. ANTONIO AUGUSTO XAVIER

Em 31 de Outubro de 1928 apresentámos á Sociedade Brasileira de Biologia um trabalho em que se registavam alguns factos sobre a acção vaso-motora da agua distillada e das soluções hypo e hypertonicas de chloreto de sodio (1).

Usámos em nossas experiencias a preparação de LAEWEN-TRENDELENBURG (perfusão das patas posteriores da rã: canula affluente na aorta; canula effluente na veia abdominal). Como liquidos hypo e hypertonicos, empregámos soluções de chloreto de sodio de differentes concentrações (de 0,1 a 0,6 p. 100 para as soluções hypotonicas; de 1 a 7 p. 100 para as soluções hypertonicas).

Os nossos resultados foram os seguintes:

1) A agua distillada exerce sempre uma acção vaso-constrictora muito energica. 2) As soluções hypotonicas de chloreto de sodio determinam igualmente vaso-constricção, tanto mais nitida quanto mais baixa é a concentração osmotica da solução. 3) As soluções moderadamente e fortemente hypertonicas produzem uma vaso-dilatação bastante energica, mas muito curta, substituida progressivamente por uma vaso-constricção duradoura. 4) As soluções hypo e hypertonicas, cuja concentração é proxima da concentração isotonica, são indifferentes. 5) Após a perfusão de soluções fortemente hypertonicas, a preparação não torna mais á sua condição primitiva; entretanto as soluções moderadamente hypertonicas não produzem alterações definitivas. A agua distillada e as soluções hypotonicas, do mesmo modo, não determinam modificações irreversiveis.

FLATOW e MORIMOTO (2) verificaram tambem a acção da agua distillada e das soluções hypo e hypertonicas de chloreto de sodio, mas com technica differente e resultados tambem inteiramente differentes dos nossos. Esses auctores realisaram experiencias em cães, com um methodo proposto ha pouco tempo por SCHILF (3). Com esse methodo avalia-se o estado de dilatação ou de constricção dos capillares de um determinado territorio vascular pela quantidade de sangue que se escôa de uma veia efferente desse territorio. As substancias cuja acção se quer estudar são introduzidas

---

(1) A. A. XAVIER—Sur les éffets des variations de la concentration osmotique du liquide de perfusion dans la téchniqne de LAEWEN-TRENDELENBURG. Société Brésilienne de Biologie, Séance du 31 octobre 1928.

(2) E. FLATOW und M. MORIMOTO—Ueber den gefaesserweiternden Einfluss von kleinen Adrenalindosen, Wasser, hypotonischen Kochsalzloesungen sowie von Blut beim Hunde. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1928, 131, 152

(3) E. SCHILF—Ueber die Wirkung von Atropin und Histamin [nach vorhergehenden Atropingaben] auf die Gefaesse des Hundes. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1927, 126, 37.

directamente na arteria afferente. E' necessario tornar o sangue previamente incoagulavel.

Com o methodo de SCHILF, os auctores citados, experimentando em cães, obtiveram resultados inteiramente oppostos aos por nós obtidos experimentando em rãs, com o methodo classico de LAEWEN-TRENDELENBURG. Assim, segundo FLATOW e MORIMOTO, no cão, a agua distillada e as soluções hypotonicas de chloreto de sodio produzem uma vaso-dilatação; as soluções hypertonicas determinam uma pequena vaso-constricção seguida de vaso-dilatação.

O presente artigo visa referir um novo trabalho de FLATOW (4) agora em colaboração com OSAWA, ainda sobre essa mesma questão.

FLATOW e OSAWA, posteriormente a nós (5), mas evidentemente sem terem conhecimento de nossas pesquisas, experimentaram, como nós o haviamos feito, a acção da agua distillada e das soluções hypo e hypertonicas de chloreto de sodio, usando a preparação de LAEWEN-TRENDELENBURG. Os resultados de FLATOW e OSAWA são exactamente os mesmos que os já por nós obtidos. Diante desses novos resultados, que confirmam as nossas pesquisas, deixam de existir as divergencias já por nós assignaladas em nosso primeiro trabalho.

Instituto Oswaldo Cruz, 27 de Junho de 1929.

---

(4) E. FLATOW und J. OSAWA—Der Einfluss von Wasser auf die Blutgefaesse des Frosches. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1928, 140, 220

(5) FLATOW e OSAWA fizeram suas experiencias durante os mezes de Outubro e Novembro de 1928. Nosso trabalho foi apresentado e entregue para publicação á Sociedade Brasileira de Biologia em 31 de Outubro de 1928.

Ueber die Wirkung verschiedener osmotischer Konzentrationen der Durchstroemungsfluessigkeit unter Anwendung der LAEWEN-TRENDELENBURG'schen Methode.

Von Dr. med. ANTONIO AUGUSTO XAVIER

Am 31. Oktober 1923 hatten wir Gelegenheit, der brasilianischen biologischen Gesellschaft eine Arbeit vorzulegen, in welcher einige Tatsachen ueber die vasomotorische Wirkung des destillierten Wassers und der hypo—und hypertonischen Chlornatriumloesungen dargestellt wurden (1).

Wir haben bei unseren Versuchen das LAEWEN-TRENDELENBURG'sche Praeparat benuetzt. (Durchstroemung der Hinterbeine des Frosches: zufuehrende Kanuele in die Aorta, abfuehrende Kanuele in die Bauchvene). Als hypo—und hypertonische Fluessigkeiten wandten wir Chlornatriumloesungen verschiedener Konzentration an. (von 0,1 o/o bis 0,6 o/o fuer hypotonische, von 1 bis 7 o/o fuer hypertonische Loesungen).

Die von uns erzielten Resultate waren wie folgt :

1)—Das destillierte Wasser bewies immer eine sehr energische gefaessverengernde Wirkung. 2)—die hypotonische Chlornatriumloesungen loesten ebenfalls gefaessverengerung aus, und zwar um so deutlicher, je niedriger die osmotische Konzentration der Loesung ist. 3)—die maessig oder stark hypertonischen Loesungen bewirken eine ziemlich energische jedoch sehr kurze Gefaesserweiterung, die nach und nach durch eine dauernde Gefaessverengerung ersetzt wird. 4)—die hypo—und hypertonischen Loesungen, deren Konzentration sich der isotonischen Konzentration naehert, verhalten sich indifferent. 5)—nach Durchstroemung von stark hypertonischen Loesungen kehrt das Praeparat nicht mehr in seinen urspruenglichen Zustand zurueck; indessen rufen die maessig hypertonischen Loesungen keine endgueltigen Veraenderungen hervor. Das destillierte Wasser und die hypotonischen Loesungen loesten ebenfalls keine rueckla eufigen Veraenderungen aus.

FLATOW und MORIMOTO (2) untersuchten gleichfalls die Wirkung des destillierten Wassers und der hypo—und hypertonischen Chlornatriumloesungen, jedoch unter Befolgung eines verschiedenen Verfahrens und die Resultate waren ebenfalls voellig verschieden von den unserigen. Diese Forscher machten ihre Versuche an Hunden nach einer vor kurzen von SCHILF (3) vorgeschlagenen Methode.

---

(1) A. A. XAVIER—Sur les éffets des variations de la concentration osmotique du liquide de perfusion dans la téchniq ue de LAEWEN-TRENDELENBURG. Société Brésilienne de Biologie, Séance du 31 octobre 1928.

(2) E. FLATOW und M. MORIMOTO—Ueber den gefaesserweiternden Einfluss von kleinen Adrenalindosen, Wasser, hypotonischen Kochsalzloesungen sowie von Blut beim Hunde. Archiv f. Exper. Pathol u. Pharmakol., 1928, 131, 152.

(3) E. SCHILF—Ueber die Wirkung von Atropin und Histamin [nach vorhergehenden Atropingaben] auf die Gefaesse des Hundes. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1927, 126, 37.

Vermittels dieses Verfahrens wirde der Erweiterungs—oder Verengerungszustand der Kapillaren in einem bestimmten Gefaessbezirk abgeschaetzt nach der Blutmenge die aus eine abfuehrenden Vene dieses Bezirkes ausfliesst. Die Substanzen, deren Wirkung festgestellt werden soll, werden direckt in die zufuehrende Arterie eingefuehrt. Das Blut muss vorher ungerinnbar gemacht werden.

Mit dem SCHILF'schen Verfahren erzielten die genannten Forscher bei ihren Versuchen an Hunden Resultate, die den unserigen an Froeschen, nach der klassischen Methode von LAEWEN-TRENDELENBURG angestellten voellig entgegengesetzt waren. Nach FLATOW und MORIMOTO bewirkten beim Hunde das destillierte Wasser und die hypotonischen Chlornatriumloesungen Gefaesserweiterung; die hypertonischen Loesungen riefen eine kleine Gefaessverengerung mit darauffolgender Gefaesserweiterung hervor.

Die vorliegende Arbeit weist auf eine neue, diesmal in Gemeinschaft mit OSAWA bewerkstelligte Veroeffentlichung von FLATOW (4) ueber diese gleiche Frage hin.

FLATOW und OSAWA haben nach uns (5), jedoch offenbar ohne von unseren Versuchen Kenntnis zu haben, die Wirkung des destillierten Wassers und der hypo—und hypertonischen Chlornatriumloesungen erforscht, wobei sie, wie wir es getan, das LAEWEN-TRENDELENBURG'sche Praeparat benuetzten. Die von FLATOW und OSAWA erzielten Resultate sind genau die gleichen wie die unserigen.

Angesichts dieser neuen Erbebnisse, die unsere Versuche nur bestaetigen, haben die schon von uns in unserer ersten Arbeit hervorgehobenen Abweichungen ihre Existenzberechtigung verloren.

---

(4) E. FLATOW und J. OSAWA—Der Einfluss von Wasser auf die Blutgefaesse des Frosches. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1928, 140, 220.

(5) FLATOW und OSAWA haben ihre Versuche waehrend der Monate Oktober und November 1923 angestellt, waehrend unsere Arbeit am 31. Oktober 1928 der brasilianischen biologischen Gesellschaft vorgelegt wurde.

Acções phylacticas não especificas em relação aos venenos ophidicos (*)

TRATAMENTO AUXILIAR DOS ACCIDENTES OPHIDICOS

Pelo Dr. J. VELLARD.

HISTORICO

Antes do descobrimento da sorotherapia antivenenosa, numerosas tentativas haviam sido feitas para o tratamento das mordeduras de cobras, quer com substancias chamadas anti-toxicas, taes como o permanganato de potassio ou os alcalis, tidas como capazes de destruir o veneno no organismo, quer com medicamentos diversos destinados á combater os principaes symptomas determinados pelo veneno. Dentro destes medicamentos, varios ainda são empregados como tratamento auxiliar dos accidentes ophidicos. A strychnina é um dos mais conhecidos; a sparteina, a cafeina, a tropina, a adrenalina, o oleo camphorado são tambem muito aconselhados, e o proprio alcool tem sempre numerosos partidarios. Estes differentes medicamentos eram, até agora, considerados como puramente symptomaticos, ajudando a combater a paralysia ou a sustentar o organismo.

Trabalhos recentes vieram mostrar a possibilidade de uma interpretação quanto á sua acção nos accidentes ophidicos. Já em 1894, ROUX tinha assignalado que o virus rabico e a toxina tetanica tornavam os animaes refractarios ao veneno da *vipera aspis*. M. PHISALIX retomou e desenvolveu estas pesquizas sobre a "immunidade" cruzada entre o veneno de vipera e o virus rabico, mostrando ainda, que este veneno, aquecido á uma temperatura conveniente, (75º) e tendo assim perdido a sua toxidez, mostra-se rabicido in vivo e in vitro; a injecção subcutanea ao coelho da mistura veneno aquecido + virus rabico é atoxica e confere uma immunidade solida e persistente em relação ao veneno e ao virus fixo; aquecido a 100º, o veneno de vipera conserva as suas propriedades rabicidas, mas o seu poder antivenenoso desapparece. O veneno mucoso dos batrachios possue propriedades analogas, mostrando-se capaz de vaccinar os animaes contra a raiva experimental.

Estes factos foram, a principio, explicados como provenientes da uma acção para-especifica das antitoxinas formadas, susceptiveis de neutralizar, a um grao mais ou menos elevado, neurotoxinas differentes daquellas empregadas como antigeno na immunisação dos animaes. Observações posteriores vieram demonstrar a insufficiencia desta explicação. BILLARD, nos seus primeiros trabalhos a este respeito, fallava egualmente de "immunisação não especifica das neurotoxinas entre si"; tinha elle constatado entre

(*) Lido na IV. Conferencia Sul-Americana de Hygiene, Microbiologia e Pathologia, Rio, 4. VII. 1929.

outros factos que cobayas immunisados com toxina tetanica resistiam á injecção posteriora de doses certamente mortaes de toxina diphterica e de veneno de vipera; a immunisação com a toxina diphterica protegia contra o veneno de vipera, mas não contra a toxina tetanica; a immunisação com o veneno não tinha nenhuma protecção contra as duas outras toxinas. Porém, procurando explicar estes resultados, elle foi levado a verificar que não se trata de uma immunisação verdadeira, mas sim de uma protecção particular, que elle denominou "acção phylactica", protecção esta conferida pela injecção de uma substancia neurotoxica, antigenica ou não, em relação a outras substancias tendo as mesmas affinidades; a primeira injecção, impregnando e saturando os elementos sensiveis, não lhes permittiria mais, segundo esta theoria. fixar uma segunda substancia; assim é que o formol pode proteger contra as toxinas diphterica e tetanica, o veneno de vibora, a sparteina; a mesma sparteina permitte á cobaya de resistir a 10 D. m. m. de veneno de vibora, etc.

Algumas aguas mineraes mostraram propriedades analogas, porém, a sua acção é muito variavel segundo as fontes, cada uma dellas agindo especialmente sobre uma determinada substancia. É por um mecanismo semelhante que BILLARD explica ainda a inocuidade das anatoxinas formoladas, o formol impregnando muito rapidamente o nevraxe e tornando impossivel a fixação da toxina de penetração mais lenta. Esta theoria de BILLARD, bastante seductora á primeira vista, é porém susceptivel de muitas objecções. Resultados tão nitidos não foram aliás sempre obtidos; RAMON e ZOELHER, por exemplo, não lograram verificar resistencia particular em relação á toxina diphterica nas cobayas immunisadas com a antitoxina tetanica, discordancia esta que BILLARD attribue á acção do formol contido na anatoxina. Mas estes trabalhos chamaram a attenção para aquellas questões. Assim DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, TISSIER e LAFAILLE puderam proteger como fez BILLARD, cobayas contra uma dose mortal de toxina diphterica ou tetanica, empregando a sparteina; em relação á toxina tetanica, a strychnina mostrou-se pouco activa; a cocaina e o curare permaneceram inactivos. J. SCHUBERT verificou o poder antitoxico *in vitro* da cocaina, da morphina, da heroina sobre a toxina tetanica e a ricina, emquanto que a nicotina não é modificada por nenhuma substancia. Com a lobelina e a camphora, H. WADA não obteve nenhuma sobrevivencia nas cobayas que tinham recebido veneno de *Ancistrodon blonakoffi* (injecções separadas). PICADO não logrou proteger o coelho contra o veneno de *Naya* só com a sparteina, ao contrario do que se observa com o veneno de vibora, porém o animal sobreviveu com um tratamento mixto com sparteina (via venosa) e eosina associada á trypsina (localmente). RYUZO KATAGI neutralizou a acção curarisante do veneno de *tetrodon* sobre o musculo da rã com a guanidina, a strychnina, a cafeina, a camphora, a strophantina e a adrenalina. Varios corantes, o vermelho Congo, Azo-Wallblau, o azul de toluidina, o Diamiblau, permittiram a HANZLITO e BUTT proteger por injecção preparada (drogas na veia, toxina por via muscular) animaes coutra as toxinas botulinicas e diphtericas, e com mais difficuldade contra a toxina tetanica; obtiveram egualmente bons resultados com o veneno de *Naya*, porém, sómente por meio de injecções misturadas (veia); outras substancias ha que só agem após contacto.

E' interessante approximar estas pesquizas das de WALBUM sobre a metallotherapia, sobretudo na infecção tetanica experimental; a injecção de saes de Mn permittiu salvar camondongos que tinham recebido esporos virulentos de tetano; com doses convenientes de saes, WALBUM pude mesmo verificar que estes esporos ficam vivos por bastante tempo dentro do organismo; pouco a pouco, elles vão perdendo da sua virulencia, nunca apresentando porém os camondongos signaes de tetano.

Tentativas empiricas, tendo uma certa relação com estes estudos experimentaes actuaes, tinham sido feitas, ha já muito tempo, aliás sem resultado, para tratar certas affecções nervosas, mórmente a epilepsia, enxaquecas, nevralgias, pela injecção de venenos ophidicos. Uma crença popular, espalhada pela America do Sul, attribue mesmo á picada do *Crotalus terrificus* (cascavel) a propriedade de curar a lepra, d'ahi varios accidentes mortaes. Recentemente ainda, a Salamandrina, extrahida do veneno da *Salamandra terrestre,* foi proposta para curar a epilepsia (Stuchlik); um muito antigo remedio chinez para o tratamento da epilepsia e outras affecções nervosas, o *senso*, contém entre outros ingredientes, forte proporção de veneno de sapo.

PARTE EXPERIMENTAL

Para facilitar a relação das nossas pesquizas, nós sómente nos occuparemos, neste primeiro trabalho, dos venenos ophidicos; o estudo das differentes toxinas e do virus rabico será emprehendido num trabalho posterior.

Os venenos destinados a este estudo foram escolhidos com propriedades muito differentes uns dos outros: veneno de *Crotalus terrificus* LAUS ou cascavel; este veneno age no pombo sobretudo como veneno neurotoxico, paralysante; veneno de *Lachesis jararaca* WIED. (syn. de L. lanceolata dos autores brasileiros, nec de *L. lanceolata* LAC. da Martinique), essencialmente coagulante e proteolytico; enfim veneno de *Naya tripudians*, enviado pelo Haffkins Institute, de Bombaim, principalmente neurotoxico e anticoagulante. A pequena quantidade deste ultimo, á nossa disposição, não nos permittiu fazer ao seu respeito, um estudo tão completo quanto ao dos dous precedentes.

As substancias medicamentosas, em numero de doze, por nós estudadas, eram igualmente de natureza e acção mui diversa: *sulfato de sparteina, sulfato de strychnina, chlorhydrato de adrenalina, cafeina, chlorhydrato de morphina, sulfato de atropina, chlorhydrato de cocaina, chlorureto de manganez, hydrochlorato de pilocarpina, oleo camphorado, digitalina e alcool.*

TECHNICA

A technica empregada consistia em verificar a acção da substancia em estudo, sobre a intoxicação determinada pela injecção de uma ou varias doses mortaes de veneno. Afim de bem pôr em evidencia esta acção, realizamos com cada medicamento numerosas series de experiencias, fazendo variar os differentes factores que entravam em jogo: Via de introducção, intervallo entre as injecções, doses de veneno, doses de medicamentos. O animal de experiencia sempre foi o pombo, por ser muito sensivel aos venenos ophidicos.

Cada medicamento foi estudado de duas maneiras differentes: primeiro, depois do contacto *in vitro* com o veneno; depois em injecção separada, afim de evitar qualquer causa de erro, devida a uma alteração possivel do veneno pelo medicamento, analoga áquella verificada com o permanganato ou os alcalis. O tempo de contacto ou o intervallo entre as injecções variava em cada experiencia, segundo a seguinte disposição geral, susceptivel de modificações segundo os resultados obtidos:

Injecções misturadas:

1) Injecção de veneno + medicamento, misturados na seringue, sem ter sido deixados em previo contacto.
2) Injecção de veneno + medicamento, após 1 hora de contacto in vitro.

Injecções separadas:

3) Injecções das 2 soluções, em dous lugares differentes, no mesmo momento.
4) Injecção das duas soluções, em logares differentes, á 1 hora de intervallo; em uma primeira serie, o medicamento é injectado em primeiro logar, afim de verificar a sua acção preventiva; numa segunda serie, elle é injectado após o veneno, afim de verificar a sua acção curativa.

Nossas experiencias foram repetidas, tanto quanto foi possivel, por via venosa e por via muscular, com excepção de algumas substancias cuja toxidez, tal como a strychnina, ou a natureza, tal como a do oleo camphorado ou do alcool, impedia a sua introducção por via venosa.

Venenos—Afim de igualar as pequenas differenças individuaes de sensibilidade, que existem no pombo, embora sejam menos accentuadas que na cobaya, temos empregado como 1ª dose, uma dose um pouco mais forte que a D. m. m.; esta precaução é indispensavel, 10 a 15 o/o dos animaes escapando á morte ou apresentando uma sobrevivencia muito variavel com a D. m. m. limite. As doses minimas, *certamente mortaes*, verificadas com varias testemunhas para cada serie de experiencia com os 3 venenos estudados são os seguintes:

V. de *Cr. terrificus*: via venosa: 0,002 mg. (morte entre 2 e4 horas).
via muscular: 0,004 mg. (morte entre 10 e 15 horas).
V. de *L. jararaca*: via venosa: 0,10 mg. (morte entre 20 e 30 minutos); já com 0,06 mg., 60 o/o das testemunhas morrem; com 0,08 mg., alguns raros animaes sobrevivem.
via muscular 1 mg. (morte entre 8 e 12 horas).
V. de *N. trupudians*: via venosa, unica empregada: 0,10 mg. (morte em 40 e 60 minutos).

Estas pesquizas necessitam do emprego de varios animaes para cada experiencia. Com effeito não se trata, como na dosagem de um soro antitoxico, de verificar a acção directa do medicamento em estudo, sobre um veneno; pelo contrario, são estes elementos que vão agir, ambos separadamente, sobre o organismo vivo, nelle provocar reacções complicadas, e mo-

dificar a sua receptibilidade. Para afastar tanto quanto foi possivel as variações, cada experiencia foi repetida com 3 animaes no minimo, e mesmo com um numero maior, quando os primeiros resultados não concordavam entre si. E' com tal methodo de fiscalização que pudemos estabelecer os seguintes quadros (vide paginas 161 e 162) resumindo as nossas pesquizas proposito de cada medicamento estudado.

DISCUSSÃO

Os resultados resumidos nestes quadros levam a um certo numero de considerações interessantes.

Varios dos medicamentos experimentados, mostraram accentuada acção protectora, uma "acção phylactica" para empregar a expressão de BILLARD, em relação aos venenos ophidicos, permittindo aos animaes supportar sem accidentes graves a injecção posteriora de uma dose certamente mortal de veneno. Esta acção foi muito mais notavel sobre os venenos neurotoxicos de *C. terrificus* e de *N. tripudians* que sobre o de *L. jararaca*, pobre em neurotoxinas, e cuja acção local não foi modificada. Em condições experimentaes identicas, sómente tres medicamentos, a strychnina, a adrenalina, a cafeina, lograram proteger contra o ultimo veneno; emquanto que seis, a sparteina, a adrenalina, a cafeina, a atropina, a pilocarpina e o chloreto de Mn, mostraram-se activos com o veneno de *N. tripudians*; cinco evitaram a morte (sparteina e adrenalina), ou determinaram uma grande sobrevivencia (morphina, pilocarpina e chlorureto de Mn) com o de *C. terrificus*, e outros tres retardaram ligeiramente a evolução dos accidentes (strychnina, cafeina, cocaina).

A acção dos diversos medicamentos não se manifestou da mesma maneira em relação a cada um destes venenos; sómente a adrenalina protegeu contra os tres; a sparteina permittiu salvar animaes com os venenos de *C. terrificus* e de *N. tripudians*, porém mostrou-se completamente inactiva em relação aquelle de *L. jararaca*; a strychnina, pelo contrario, protegeu bem contra o ultimo veneno, mas nada fez contra o veneno de *N. tripudians* e retardou ligeiramente a morte com aquelle de *C. terrificus*. A morphina, bastante activa contra o veneno de *C. terrificus*, é desprovida de acção quanto aos dous outros.

Não menos differentes são as condições nas quaes actuam esses diversos medicamentos. Assim a sparteina possue mais accentuado poder protector, quando injectada uma hora antes do veneno, outros, pelo contrario, taes como a adrenalina e a morphina, mostraram-se mais efficazes quando injectados no mesmo tempo ou alguns minutos sómente antes ou depois do veneno. Applicados mais tardiamente, após o apparecimento dos primeiros symptomas da intoxicação ophidica, nenhum delles mostrou-se activo.

A via de introducção dos medicamentos tem tambem grande importancia; a mesma dose de cafeina, por exemplo, injectada uma hora antes do veneno de *L. jararaca*, protege sómente por via muscular, a sua eliminação sendo rapida demais por via venosa.

Em nenhum caso, os symptomas determinados pelos medicamentos, strychnina, sparteina, etc. . . foram modificados pela injecção dos venenos.

QUADRO I.—Injecções separadas. Medicamento v. muscular 1 hora antes do veneno (v. venosa).

MEDICAMENTO	Veneno de *C. terrificus* 0,002 mg.			Veneno de *L. jararaca* 0,10 mg.			Veneno de *N. tripudians* 0,10 mg.			OBSERVAÇÕES
	Protecção completa	Protecção ligeira	Protecção nulla	Pretecção completa	Protecção ligeira	Protecção nulla	Protecção completa	Protecção ligeira	Protecção nulla	
Sparteina: 15 mgs.	0					† 17'	s			Testemunhas: 0,002 mg. v. C. t. via venosa. † 2-4 horas
Strychnina: 0,4 mg.		† 5-6 horas		0					† 50'	
Adrenalina: 0,5 mg.	s			0			0			0,10 v. L. j. via venosa, † em menos de 1 hora
Cafeina: 20 mgs.		† 5-6 horas		0			0			0,10 mg. v. N. t. via venosa. † 40'-60'
Morphina: 20 mgs.		† 24 horas				† 13'			† 90'	
Atropina: 20 mgs.			† 2h. 30'			† 22'	S. R.			
Cocaina: 5 mgs.		† 5-6 horas				† 10'			† 95'	
Pilocarpina: 20 mgs.		† 12 horas				† 50'	0			
Digitalina: 10 mgs.			† 4 horas			† 50'		† 120'		
Oleo camphorado: 0,5 cc.			† 3 horas			† 30'			† 55'	
Alcool: 5 cc.			† 3 horas			† 16'			† 90'	
Chlorureto de Mn: 10 mgs.		† 8 horas				† 25'	0			

Abreviações: 0=nenhum symptoma — s=symptomas leves — S=symptomas graves — p=paresia — P=paralysia — R=restabelecimento — †=morte.

QUADRO II.—Injecções mixtas.

MEDICAMENTO	Veneno de *C. terrificus*				Veneno de *L. jararaca*				OBSERVAÇÕES
	Sem contacto previo		1 hora de contacto in vitro		Sem contacto previo		1 hora de contacto in vitro		
	V. venosa	V. muscular	V. venosa	V. muscular	V. venosa	V. muscular	V. venosa	V. muscular	
Sparteina : 15 mgs.	——	0,005=0 0,010=P. R.	——	——	——	1 mg. † 6 h.	——	1 mg. S. R.	Testemunhas : V. *C. terrificus*.
Sparteina : 10 mgs.	——	0,005=0 0,010=† 22 h.	——	——	——	——	——	——	
Strychnina : 0,4 mg.	——	0,005=† 36 h.	——	0,005=† 36 h.	——	——	——	1 mg. † 12 h.	0,002 v. venosa=† 2-4 horas.
Adrenalina : 0,1 mg.	0,002=† 160'	——	——	——	0,10=0 0,15=† 21 h.	——	0,20=S. R. 0,30=† 3'	——	0,004 v. venosa=† 2 horas.
Adrenalina : 0,5 mg.	——	0,005=0 0,008=† 10 h.	——	0,008=† 21 h.	——	1 mg. † 10 h.	——	——	0,004 v. musc. =† 10-15 horas.
Cafeina : 20 mgs.	0,002=† 14 h.	0,005=p. R. 0,010=† 18 h.	——	0,005=p. R.	0,10=s. R. 0,15=† 8'	——	0,15=† 7'	——	0,005 v. musc. =† 10-15 horas.
Morphina : 20 mgs.	0,002=P. R.	0,005=0 0,008=† 36 h.	0,02=P. R.	—	0,10=† 11'	——	0,10=† 20'	——	0,010 v. musc. =† 5-7 horas.
Atropina : 20 mgs.	——	0,005=0 0,010=† 5 h.	——	0,010=† 5 h.	——	——	——	——	
Atropina : 10 mgs.	0,002=0	——	——	——	0,10=0 0,15=† 4 h.	——	——	——	Veneno da *L. jararaca*
Cocaina : 5 mgs.	——	0,005=P. R.	——	0,005=P. R.	——	——	——	1 mg.=† 12 h.	
Digitalina : 20 mgs	——	0,005=† 3 h.	——	0,005=† 2 h. 50'	——	——	——	1 mg.=† 10 h.	
O. camphorado : 0,5 cc.	——	0,005=0 0,008=† 14 h.	——	0,008 =† 14 h.	——	——	——	1 mg.=† 12 h.	0,10 mg. v. venosa=† em menos de 1 hora
Chloreto de Mn: 2 mgs.	0,002=† 6 h. 0,003=† 90'	——	0,002=0 0,003=† 5 h	——	0,10=† 10'	——	0,10=0 0,15=† 4'	——	
Chloreto de Mn: 10 mgs.	——	——	——	——	——	——	——	——	1 mg. v. musc. =† 8-12 horas.

Mesmas abreviações que no quadro I.

A interpretação destes factos é difficil. Não se pode tratar de uma destruição do veneno pelo medicamento, analoga áquella exercida in vitro pelo MnO^4k ou os alcalis, pois esta acção protectora se dá egualmente in vivo, por injecções separadas.

Hypotheses diversas podem ser formuladas para explicar esta acção in vivo.

A primeira que se apresenta é de um antagonismo pharmacologico entre os venenos e os medicamentos estudados, cuja acção viria oppôr-se directamente áquella dos venenos ou augmentar a resistencia physiologica do organismo. Sobre esta hypothese repousava em grande parte o emprego da medicação symptomatica empregada nos accidentes ophidicos, por exemplo da strychnina e do oleo camphorado para combater os phenomenos paralyticos, e da adrenalina e da cafeina para sustentar o coração. O resultado da nossa experiencia não concorda com este modo de ver: assim a strychnina é pouco activa sobre os venenos paralysantes de *C. terrificus* e de *N. tripudians*, enquanto que a morphina mostrou, nas mesmas condições, acção nitida na intoxicação crotalica. As propriedades pharmacologicas da sparteina e da adrenalina tambem não permittem explicar por este mecanismo, o muito elevado poder protector destes dous medicamentos contra os venenos paralysantes. Enfim, esta acção antagonica deveria se exercer mesmo após o apparecimento dos primeiros symptomas da intoxicação ophidica, o que não se dá, pois estes medicamentos são mais ou menos desprovidos de acção curativa.

Uma acção indirecta sobre o organismo, quer retardando a absorpção, ou facilitando a eliminação rapida do veneno antes da sua fixação, quer estimulando diversas reacções naturaes de defeza, não parece-nós tambem trazer uma explicação satisfactoria dos factos observados. Medicamentos de acção opposta, como a atropina e a pilocarpina, mostraram-se ambos activos; pelo contrario a acção da digitalina é quasi nulla, emquanto que a cafeina possue grande poder protector contra os venenos de *C. terrificus* e de *N. tripudians*. Da mesma maneira, as nossas experiencias com a adrenalina, sobretudo em relação ao veneno de *L. jararaca*, não permittem attribuir ás propriedades vaso-constrictoras d'este medicamento a sua tão accentuada acção sobre os venenos estudados. Quanto á uma acção estimulante sobre as defesas do organismo, analoga áquella observada por WALBUM com a metallotherapia nas injecções tuberculosas e tetanicas, a rapidez de evolução dos accidentes ophidicos torna a sua importancia muito secundaria.

Para explicar a acção da sparteina sobre o veneno de vipera, BILLARD tinha imaginado, como já temos visto, outra hypothese mais interessante, avizinhando-se á certos pontos de vista, daquella já apresentada a proposito da acção anticurarisante de varias snbstancias taes como a adrenalina. Segundo esta theoria, a sparteina e o veneno possuiriam uma acção necrotica semelhante, e seriam ambos curarisantes; injectada a primeira, a sparteina impregnaria o nevraxe que tornar-se-ia durante todo o periodo desta impregnação, incapaz de fixar outras substancias; haveria assim, por parte da sparteina, uma protecção local não especifica "uma verdadeira vaccinação" do tecido nervoso. Esta theoria muito simples é seductora; ella permitte explicar commodamente como certos medicamentos, de acção

pharmacologica diametralmente opposta, taes como a strychnina e a morphina, a atropina e a pilocarpina exercem uma protecção analoga contra os venenos ophidicos. Ella não satisfez porém em relação a certas criticas. Assim BILLARD tinha pensado ser necessario pôr as suas cobayas em estado de mal sparteinico, afim de assegurar a sua protecção contra o veneno de vipera. Em nossas experiencias, temos observado que esta protecção existe no pombo, mesmo com doses de sparteina inferioras á dose toxica; não se trata pois de uma "impregnação" ou de uma saturação do nevraxe pela sparteina. Mais ainda esta acção protectora não é um phenomeno reversivel, como permittiria de suppôr esta hypothese, nenhum dos nossos venenos tendo se mostrado capaz de evitar ou mesmo de diminuir os symptomas de intoxicação determinados pelos medicamentos estudados.

Experiencias complementares, actualmente em realização, são necessarias para poder apreciar bem o valor da hypothese de BILLARD nestes phenomenos. Fóra esta acção protectora "in vivo" quasi todos os medicamentos estudados mostraram "in vitro", sobre os venenos, acção neutralizadora mais ou menos accentuada, augmentando ainda após certo tempo de contacto 15 mgs de sparteina, por exemplo, misturados no momento da injecção por via muscular com 1 mg de veneno oe *L. jararaca*, são incapazes de poupar a morte dos animaes, emquanto que estes escapam, si o veneno e a sparteina ficaram em contacto durante 1 hora. A strychnina parece desprovida de poder anti-toxico in vitro; este é, pelo contrario, muito accentuado com a adrenalina, da qual 0,1 mg protege, por via venosa, contra 0,2 mg de veneno de *L. jararaca* depois de 1 hora de contacto in vitro, e sómente contra 0,1 mg sem o contacto previo. Exceptuando-se o alcool que coagula as proteinas dos venenos, o oleo camphorado que contem acidos gordurosos podendo possuir uma acção neutralizadora propria, e o chloreto de Mn que determina nos venenos abundante floculação, nenhum dos outros medicamentos estudados, logrou determinar in vitro alteração apparente dos venenos, coagulação, floculação, precipitação etc.

Esta attenuação "in vitro" provem provavelmente de uma attenuação das toxinas ophidicas, analoga áquella já assignalada por varios autores com a adrenalina em relação ás toxinas diphtericas e tetanicas, e não sem alguma analogia com a acção do formol. Outra semelhança existe ainda entre a acção deste ultimo sobre os venenos e aquella dos medicamentos, agora estudadas: a facilidade relativa de attenuar as neurotoxinas dos venenos emquanto que a acção necrosante local do veneno de *L. jararaca* é muito pouco modificada.

CONCLUSÕES

Em nossas experiencias, as condições nas quaes se exerce a acção dos differentes medicamentos estudados, não são uniformes, variando pelo contrario não somente segundo os medicamentos, mas ainda com cada veneno.

Nenhuma das hypotheses que temos encarado parece capaz de explicar por si só o mecanismo de tal acção protectora. Nestes phenomenos, diversos factores devem intervir. Mas, de um modo geral, parece, porém, que os medicamentos neurotropos, quasquer sejam as suas propriedades particulares, agem pondo, durante um tempo variavel, o organismo num

estado de resistencia especial em frente ás neurotoxinas ophidicas, mas não em frente dos outros elementos dos venenos, cuja acção local não é modificada. Quanto ao mecanismo intimo desta protecção, nada podemos formular á não ser hypotheses; a de BILLARD, apezar do seu interesse, nos parece insufficiente. E' provavel que a acção das substancias neurotropas não se limite a uma simples protecção passiva, impedindo pela sua presença a fiscalisação de outras neurotoxinas, mas que ellas modificam de maneira mais ou menos duradoura, as condições de excitabilidade e sobretudo de conductibilidade dos elementos nervosos. Trataremos novamente desta questão mais tarde, quando estudarmos as acções phylacticas não especificas em relação ás toxinas microbianas e ao virus rabico.

Fóra este poder protector especial, de mecanismo escuro, cada medicamento, segundo as suas propriedades pharmacologicas especiaes, pode actuar de modo indirecto sobre a intoxicação ophidica, quer retardando a penetração do veneno ou facilitando a sua eliminação, quer mantendo as forças do organismo; uma verdadeira acção antagonica destes medicamentos sobre os venenos é, pelo contrario, muito pouco provavel.

Enfim, a maior parte destes medicamentos mostrou "in vitro" accentuada acção neutralizante em relação aos venenos estudados.

* * *

No ponto de vista pratico, estes resultados tem um certo interesse therapeutico. Mostram que nos accidentes ophidicos, o emprego, de diversas substancias neurotropas, accrescentadas ao tratamento pelos sôros como medicação auxiliar, longe do possuir inconvenientes, pode, pelo contrario, ajudar á combater de maneira util a intoxicação.

Experimentalmente, nenhum destes medicamentos mostrou, é verdade, acção curativa; porém, mesmo com sôros anti-ophipicos, o poder curativo, nos pequenos animaes de laboratorio, é difficilmente posto em evidencia, por causa da rapidez, nestes animaes, da intoxicação ophidica. No homem, as condições são differentes e a evolução dos accidentes mais lenta.

A acção daquellas substancias, de penetração muito rapida, pode fazer-se sentir e contribuir a retardar a marcha da intoxicação, e no mesmo tempo manter as forças do organismo, segundo as suas differentes propriedades pharmacologicas.

Dentro de todos estes medicamentos auxiliares, o mais apontado é a sparteina; vem em seguida, a adrenalina. As indicações para a cafeina e a strychnina já são mais limitadas. Com venenos muito dolorosos, taes como os de aranhas ou de escorpiões, a morphina ás vezes, mesmo a cocaina, podem ser dadas sem perigo de aggravar os phenomenos paralyticos. A digitalina, pelo contrario, deve ser evitada. Enfim, o alcool, do qual se abusa tantas vezes nestes accidentes, não apresenta nenhuma vantagem para os doentes; administrado em dose alta em individuos não acostumados, já tem sido causa de accidentes graves.

O emprego destes medicamentos, em todo caso, não pode ser considerado senão como um complemento do tratamento sôrotherapico especifico.

O interesse principal, na nossa opinião, é de contribuir á protecção do organismo, emquanto se espera que a acção dos sôros, sempre bastante lenta, tenha o tempo de se manifestar.

SOMMAIRE

Dans l'intoxication expérimentale du pigeon avec les venins de *Crotalus terrificus*, de *Lachesis jararaca* et de *Naya tripudians*, nous avons étudié l'action de 12 médicaments, possédant des affinités neurotropes plus ou moins accusées, arrivant aux conclusions suivantes :

1—Quelques-uns des ces médicaments exercent une action protectrice spéciale contre ces venins, permettant, injectés une heure avant le vénin, d'eviter tout symptôme d'intoxication chez le pigeon. Certains n'agissent qu'injectés en même temps que le vénin. D'autres sont complètement inactifs. Aucun d'entre eux ne possède de propriétés curatives.

2—En plus de ce pouvoir protecteur, ou phylactique, un certain nombre d'entre eux possède sur les venins, une action neutralisante "in vitro", s'accentuant après une heure de contact.

3—Les conditions dans lesquelles s'exercent ces deux actions, protectrice et neutralisante, sont très variables suivant les venins et les médicaments. Sur leur mécanisme très complexe, on ne peut actuellement formuler que des hypothèses.

4—Au point de vue pratique, certains de ces médicaments, surtout la spartéine et l'adrénaline, peuvent être utilisés avec avantage comme complément du traitement sérotérapique spécifique dans les accidents déterminés par les animaux venimeux.

PRINCIPAES AUTORES CITADOS

1—BILLARD—Immunité non spécifique des neurotoxines entre elles. *C. R. Biologie* 1926—Pouvoir anagotoxique de certaines eaux minérales. *Ibid.* Juillet 1926—Pouvoir anagotoxique de quelques eaux minérales d'Auvergne. *Presse medicale.* 8 Janvier 1927—Phylaxie non spécifique et immunité spécifique. *C. R. Biologie.* Février 1927—Philaxie non spécifique. *Progrès médical.* 20 Mai 1927.

2—DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, TISSIER et LAFAILLE—Sur les effets des toxines diphtérique et tétanique chez les animaux soumis à l'action de certains poisons. *C. R. Biologie* 97. 1927.

3—HAMZLITO a. BUTT—Prevention of toxin poisoning with colloidal dyes. *Journ. of pharm. a. exp. thes.* 33. 1928.

4—HOUSSAY y NEGRETE—Nuevos estudios experimentales sobre la acción physiologica de las ponzoñas de las arañas. *Rev. del Inst. Bact. B. Ayres* 2. 1919.

5—MARIE—Glandes surrénales et toxi-infections. *Zeits. f. Immf. Orig.* 17. 1913. 17.—Id. *An. Inst. Pasteur* 32. 1918.

6—MOREIRA DA FONSECA (J)—Systema chromaffino. *These.* Rio de Janeiro 1913.

7—PANELLA citado por MOREIRA DA FONSECA.

8—M. PHISALIX—Animaux venimeux et venins. Paris 1922—Immunité naturelle des vipères et des couleuvres contre le venin des batraciens. . . *Journ. Physiologie et Pat. générales* Septembre 1909—Pouvoir rabicide in vitro du venin de vipère aspic. *C. R. Ac. des Sciences*: 186. 1928—Vaccination contre le venin de vipère et la rage expérimentale. . . Ibid. 187. 1928.

9—M. PHISALIX et F. PASTEUR—Les rayons ultraviolets détruisent le pouvoir rabicide du venin de la vipère aspic *C. R. Ac. Sciences.* 186. 1928.

10—PICADO—Traitement diastasiqne de l'envenimation cobraïque expérimentale. *C. R. Biologie.* 98. 1928.

11—RAIMUNDA J. M.—Contribuição para o estudo dos chamados segredos contra a mordedura das cobras peçonhentas. *Arg. indo-port. Med. Hist Nat.* 3. 1925.

12—RAMON et ZOELLER—Les acquisitions théoriques et pratiques dues à l'anatoxine diphtérique. *Paris Medical* Dec. 1926.

13—ROGERS—On the physiological action and antidotes of. . . venoms. *Proc. R. Soc.* 1903—A lecture of the physiological actions and antidotes of snake venoms. . . *Lancet* 1904.

14—ROUX—*Com. congrès Budapesth.* 1894.

15—RYUZO KATAGI—Der Einfluss einiger erregender Gifte auf die Wirkung des Tetrodontoxins an Skeletmuskel. *Ref. 2. f. ges. Phys. exp. Pharm.* 39. 1927.

16—SCHUBERT—Studien ueber Tetanustoxin, Ricin und einige Alkaloiden und ueber ihre Entgiftung. *Z. f. Immf. Orig.* 57. 1928.

17—SHARP, NEVILLE ALEX. DYCE. The treatment of Scorpion Sting. *Journ. of Trop. med. a. Hyg.* 27. 1924.

18—STUTZER—Ueber Wirkung von Adrenalin auf Bakterien und Diphteria—toxin. *Zeits. f. Immf. Orig.* 22.

19—STUCHLIK—Ueber die Behandlung der Epilepsie mit Salamandrin *Bratisl. Lakar* 6. 1927. (*Ref. Centralb. Bakt. Ref.* 89.

20—TROISE—Estudio farmacológico de la ponzoña del Latrodectus mactans. *Rev. Soc. Argentina Biol.* IV. 1928.

21—VANCE—Red Back Spider Bite. *Med. Journ. Australia.* I. 1922.

22—WADA, HEIMU—Experimental studies on treatment of bite of snakes (Anc. Homkoffi). *Japan. med. World.* 7. 1927.

23—WALBUM—Metallsalztherapie. *Zeitsch. f. Immf.* 43. 1925.—Ibid. 47 1926—Ibid. 49. 1927—Metallsalztherapie. Tetanus und Tuberkulose. *Zeits. f. Tuberkulose* 48. 1927—Metallsalztherapie und Metallsalzprophylaxie. Tuberkulose. *Zeits. f. Tuberkulose* 51. 1928.

DA HEREDO-INFECÇÃO NA TUBERCULOSE (1)

Pelo Dr. A. FONTES

Chefe de Serviço do Instituto Oswaldo Cruz

"Outro ponto muito importante a elucidar é o da herança tuberculosa; nada impede que a granulação se transmitta ao féto, attendendo as dimensões d'ella, que são compativeis com a passagem atravéz o filtro".

". . . . . poderá ser substituida senão inteiramente, pelo menos em grande parte dos casos a *noção de terreno tuberculisavel pela de tuberculose em potencial*".

A. FONTES (1910)
Mem. do Inst. Osw. Cruz (1)

Devemos entender por heredo-infecção na tuberculose a transmissão do virus tuberculoso da mãe ao feto, através da placenta, com integridade do tecido placentario.

É, pois, o *transfert* do virus do organismo materno ao organismo do feto, em condições de integridade anatomica dos tecidos da placenta, o que caracterisa a herança da semente.

É, por consequencia, a heredo-infecção um caso particular do contagio congenito que occorre quando ha lesão dos vasos ou tecidos placentarios, que permitte a passagem directa do elemento infectante.

Ambos os casos se enquadram na denominação generica de heredo-contagio.

Bem differente é a concepção bio-pathologica assim estabelecida, da concepção biologica pura da herança, em que intervem a noção fundamental de transmissão á descendencia, por alterações intimas dos elementos geradores, dos caracteres ancestraes que são conservados com caracter especifico na evolução da especie.

Sob o prisma, pois, do heredo-contagio é que devemos estudar a possibilidade da transmissão do virus tuberculoso, da mãe ao feto, na vida intra-uterina, na independencia de phenomenos morbidos que possam estabelecer a passagem directa do virus.

Neste segundo caso haverá o contagio intra-uterino por condição accidental; haverá herança da semente por condição pathologica immanente á placenta; o virus será encontrado na maioria das vezes no organismo do feto, sob a sua forma visivel, classica, acido-resistente e se revelará na herança morbida pela *tuberculisação* do nascituro.

No primeiro caso a heredo-infecção se produz pelas trocas osmoticas dos liquidos nutritivos maternos e fetaes, sangue e lympha, dando origem

(1) Memoria apresentada ao 2o. Congresso Pan-Americano de Tuberculose, reunido no Rio de Janeiro de 30 de Junho a 7 de Julho de 1929.

a um estado, senão pathologico ao menos miopragico, capaz de mostrar variantes que attinjam em ultima modalidade a alteração especifica dos tecidos tuberculisados.

A physionomia especial que ao organismo infectado é conferida por este typo de infecção, em suas modalidades attenuadas, deriva da physiopathologia do *terreno tuberculisavel*, expressão por que é conhecida em pathologia a dyscrasia organica que caracterisa os filhos de tuberculosos.

Nestes casos não se póde pôr em evidencia o elemento infectuoso em sua forma classica, de bastonete acido-alcool-resistente.

A acção morbigena do virus é entretanto reconhecida em seus effeitos: hyperplasia do systema lymphatico, fragilidade da funcção circulatoria, alterações de nutrição decorrentes da instabilidade da funcção endo-crinica, etc., etc., caracteres morbidos que se confundem com os que possam ser attribuidos a elementos toxicos de acção duradoura e que por sua durabilidade ou permanencia por prazos mais ou menos longos, originam uma constituição morbida especial que confina com os estados que hoje em dia se enquandram na *pre-tuberculose.*

Decorre assim a noção da herança de terreno que, entretanto, nada mais representa que a infecção tuberculosa em modalidade especial, attenuada, e que com as modificações humoraes e da physio-pathologia cellular que provoca, estabelece o estado de allergia instavel á infecção classica.

Confundem-se pois, as noções de infecção e de intoxicação pela identidade de effeitos que se manifestam não só pelas alterações funccionaes, como ainda, pela producção de alterações anatomicas.

A infecção tuberculosa nos demonstra o que ficou dito com o estudo do virus filtravel.

Ahi, onde não se póde pôr em evidencia a presença do bacillo de KOCH, isto é, da fórma acido-alcool-resistente do virus, o quadro morbido se apresenta comparavel experimentalmente aos que a clinica nos mostra.

Em taes casos as hypotheses de infecção e intoxicação em meu modo de pensar, não só não se repellem como se completam. A demonstração da capacidade morbigena do virus se faz na infecção da durabilidade e permanencia d'ella, em quanto que na intoxicação esta capacidade é transitoria.

Na condição de *continuidade* de acção morbigena reside, pois, a caracteristica dos elementos filtraveis do virus, capazes de entreter um estado de intoxicação chronica e de se transmittirem em serie experimental por inoculação ou em serie natural, por passagem através da placenta, da mãe ao feto.

Em alguns casos podem estes elementos filtraveis do virus tuberculoso regenerar a fórma acido-alcool-resistente, com ou sem o seu cortejo pathologico, produzindo entretanto sempre um estado allergico instavel, conducente ora á hypersensibilidade, ora á maior resistencia á acção morbigena do virus.

Comprehende-se, pois, que um estado particular de constituição humoral se estabeleça, dando a physionomia propria ao estado de pre-tuberculose, na concepção em vigencia; mas, este estado que encontra como factor pathogenico a intoxicação chronica causada pelo virus, só por elle é entretido com a permanencia da infecção. Ora, a acção physio-pathologica

dos venenos tuberculosos se traduz pela acção das substancias elaboradas pelo virus, quer se exerça ella sobre os elementos nobres dos tecidos, principalmente do tecido lymphatico, alterando a sua constituição anatomica, quer sobre o systhema hemo-poiético, passivel de analogas alterações, quer perturbando a nutrição geral, pois que a acção desses venenos se exerce sempre sobre os systhemas endocrinico e neuro-vascular, ultimos responsaveis, no entender actual, pelo automatismo das funcções reguladoras da vida somatica.

As relações desta sorte estabelecidas entre o terreno e o virus tornam-se dia a dia mais favoraveis á eclosão da doença tuberculosa que de facto já insidiosamente existe.

O poder morbigeno do virus contrabalançado pela reacção de defeza crea o estado allergico, estado especial comparavel ao estado particular de irritabilidade cellular, determinado pela solicitação toxica; originando o estado de hypersensibilidade especifica, cujo exgottamento desencandeia o choque anaphylactico.

Do equilibrio instavel humoral estabelecido pelas defezas cellulares á solicitação dos toxicos do virus, resulta o estado humoral da *pre-disposição* á tuberculose, da constituição cellular peculiar que desta intoxicação chronica deriva, se origina o *terreno tuberculisavel.*

A noção somatica decorrente dos dois factores, estabelece o quadro clinico da *pre-tuberculose,* expressão verdadeira no sentido anatomico e etiologico, mas erronea no sentido physio-pathologico, porque nestes estados morbidos a infecção já existe, e por ella é responsavel a phase, digamos sarcodial, ultra microscopica, invisivel (ultra-virus), ou granular visivel ou pré-bacteriana.

* * *

Proseguindo o estudo das fórmas filtraveis da tuberculose instituí, em Novembro de 1926, a seguinte serie experimental.

Escarro tuberculoso em emulsão em agua physiologica foi filtrado em vela CHAMBERLAND L2, depois de ter permanecido em estufa a 37°C durante 3 dias. A integridade da vela foi verificada por semeaduras do filtrado obtido, em gelose inclinada e em caldo simples e glycerinado. Os meios semeiados, mantidos quer em estufa quer á temperatura ambiente se conservaram estereis.

Com o filtrado foram injectados:

Sob a pelle (10 c.c. do filtrado) — cob. nº. 1 (macho).
« « « (10 c.c. do filtrado) — cob. nº. 2 (femea).
No peritoneo (5 c.c. do filtrado) — cob. nº. 3 (macho).

A 18 de Fevereiro de 1927 morreu a cob. nº. 1, cachectica.

A autopsia mostrou ausencia de lesões especificas e de bacillos acido-alcool-resistentes. No pulmão foram encontrados infartos e hemorrhagias capillares. O estudo dos cortes do figado, baço e ganglios e das lesões encontradas nos pulmões não revelou a presença de lesões especificas nem de bacillos acido-alcool-resistentes.

Procedi á inoculação da seguinte serie com o material proveniente deste animal.

Cob. I — Injectada sob a pelle com polpa do baço.
Cob. II — Idem, idem, com fragmentos do pulmão.
Cob. III — Idem, idem, com fragmentos do epiploon.
Cob. IV — (femea) — Injectada com agua da lavagem do pulmão e figado.

A 20-2-27 morte da Cob. I por causa intercorrente. A autopsia mostrou ausencia de lesões especificas e de bacillos acido-alcool-resistentes.

A 24-2-27 morte da Cob. III. A autopsia revelou a presença de ganglios epiploicos augmentados. Ausencia de lesões especificas. Nos ganglios epiploicos foram encontradas granulações acido-alcool-resistentes. Não foram encontradas nem nas visceras nem nos outros ganglios bacillos acido-alcool-resistentes.

Com material deste animal (ganglios epiploicos) foi inoculada uma Cob. IIIA (macho).

Em 28-2-27 morte da Cob. II. As verificações feitas por autopsia foram identicas ás da Cob. I.

A Cob. IIIA (macho) que fôra inoculada em 24-2-27 com o material da Cob. III, ao cabo de 8 dias mostrou um abcesso no ponto da inoculação, que se rompendo constituiu uma ulceração com aspecto de cancro. Preparações por esfregaço do producto da raspagem dos bordos do cancro mostraram a presença de bacillos acido-alcool-resistentes.

O ganglio inguinal satellite á ulceração apresentava-se augmentado de volume. Ao cabo de 1 mez a ulceração cicatrizou.

A 28-4-28 morte desta cobaya. A autopsia revelou a ausencia de lesões tuberculosas. Infarctos pulmonares e presença de bacillos acido-alcool-resistentes e de forma granular nos ganglios tracheo-bronchicos.

O ganglio satellite ao cancro foi extirpado. Examinado por córte e esfregaços não apresentou caseificação nem bacillos acido-alcool-resistentes.

O resto do material foi inoculado sob a pelle de uma outra cobaya.

Esta ultima morreu 5 dias mais tarde, sem lesão e sem causa apparente; as culturas feitas com o sangue do coração permaneceram estereis.

O mesmo ganglio foi deste animal transplantado para um outro sob a mesma technica.

Este ultimo animal morreu 5 dias depois, e, como a cobaya anterior, não apresentava lesões apparentes nem germens no sangue do coração.

A cobaya IV (femea), que fôra injectada em 18-2-27 e que cohabitava com o macho III, desde 24-2-27, pariu em 29-9-27 um filhote, o qual ao cabo de 5 dias morreu. A autopsia revelou uma zona de caseificação e de necrose no figado, hemorrhagias e infarctos pulmonares e augmento de volume de ganglios epiploicos. Ausencia de bacillos acido-alcool-resistentes.

Um pequeno fragmento de um ganglio epiploico foi inoculado sob a pelle de uma outra cobaya. Este ultimo animal mostrou após 12 dias o começo de formação de um cancro, por ulceração do ponto de inoculação. O cancro formado se conservou aberto durante 1 mez. Não foram encontrados bacillos acido-alcool-resistentes nesta lesão. O cancro cicatrizou e o

animal ainda vive, sem aspecto de tuberculose mas excessivamente gordo (peso actual 980 grammas).

Em 8-12-27 nasceram mais dous filhotes que morreram em Maio de 1928 sem lesões tuberculosas e sem bacillos mas apresentando uma polyadenia inguinal accentuada.

As cobayas 2 (femea) e 3 (macho) procrearam tambem. O primeiro filhote nasceu em 14-9-27 e morreu depois de 15 dias. A autopsia mostrou infartos pulmonares, hemorrhagias capillares do pulmão e uma zona de necrose no figado. Ausencia de bacillos acido-alcool-resistentes.

Em 8-12-27 nasceram dous outros filhotes, com aspecto normal, mas tendo os ganglios augmentados de volume. Um morreu em 8-5-28 e o outro em 14-5-28. Ambos não apresentavam nem lesões tuberculosas nem bacillos.

O quadro synoptico da pagina 173 dará idéa mais approximada do proseguimento e das observações da serie experimental acima transcripta.

* * *

A experimentação extrangeira condiz em traços geraes com as conclusões a que pude chegar e que serão expostas em outra parte deste trabalho.

Desde as communicações fundamentaes de CALMETTE, VALTIS, NÈGRE, BOQUET (2), de F. ARLOING e DUFOURT (3) grande copia de trabalhos publicados nestes ultimos annos confirma a possibilidade da passagem das formas filtraveis do virus tuberculoso através da placenta materna originando a infecção do féto.

CALMETTE, VALTIS e LACOMME (4) SERGENT, DURAND e BENDA (5), COUVELAIRE (6) em França, MOENKEBERG, ONETTO e VERGARA (7) no Chile, NISHIMOTO (8) no Japão, NASSO (9) na Italia, VAN BENEDEN (10) na Belgica, LYDIA RABINOWITSCH (11) na Allemanha, todos trazem farta documentação ao phenomeno bio-pathologico do heredo-contagio na tuberculose. E da experimentação apresentada resulta que o contagio se dá independentemente de lesão da placenta, assumindo a expressão *herança de semente*, toda a plenitude de sua significação biologica.

A observação clinica traz ainda ampla documentação ao phenomeno citado.

ARLOING e DUFOURT (3) em 1926 communicam á Academie de Medecine de Paris o seguinte caso:

Parto prematuro no 7º mez, de mãe tuberculosa com lesões pulmonares avançadas, em 31 de outubro de 1925. Féto pesando 1.310 grs.; peso da placenta 310 grs.

A criança immediatamente separada da mãe é criada em *couveuse*.

O exame somatico da criança nada revela. A temperatura oscilla 34º2 e 35ºC. A 9 de Novembro a temperatura attinge a 37º e se mantem assim até os ultimos dias.

COBAYAS INJECTADAS COM EMULSÃO DE ESCARRO TUERCULOSO APOS PERMANECER EM ESTUFA A 37oC. DURANTE TRES DIAS E FILTRADA EM VELA CHAMBERLAND L2 (19—11—26).

Cob. inj. sob a pelle (2) 10 c.c. do filtrado

1) *Morte.* (18-2-27) CACHEXIA. Autop. ausencia de lesões especificas e de bacillos alcool-acido-resistentes INFARCTUS e HEMORRHAGIAS PULMONARES. Material retirado para inoculação.

2) Viva FEMEA. B

Cob. I Inj. polpa do baço. *Morte* em 20-2-27. Causa intercurrente. Ausencia de lesões especificas e de bacillos acido-alcool-resistentes.

Cob. II Inj. polpa do pulmão. *Morte* em 28-2-27 Idem Idem cob. I.

Cob. III Injectada com fragmento de epiploon. *Morte* em 24-2-27. GANGLIO EPIPLOON AUGMENTADO. PRESENÇA DE GRANULAÇÕES ACIDO-ALCOOL-RESISTENTES. Inoculação deste material em 1 cob. IIIa (MACHO)

Cob. IIIa. *8 dias depois abcesso e formação de Cancro.* PRESENÇA NA LESÃO DE BACILLOS ACIDO-ALCOOL-RESISTENTES. GANGLIO INGUINAL AUGMENTADO, cicatrisação da ulcera ao cabo de 1 mez. Ext. do ganglio. Ausencia de caseificação. Ausencia de bacillos.

Cob. IIIa. *Morte* em 28-4-28. Ausencia de lesão tuberculosa. CACHEXIA — INFARCTUS PULMONAR. PRESENÇA DE BACILLOS ACIDO-ALCOOL-RESISTENTES e de forma granular (ganglios tracheo-bronchicos).

Inoculação do ganglio sob a pelle de 1 cobaya.

Morte. 5 dias depois sem lesão. Sangue do coração esteril. Passagem do mesmo sangue em outra cobaya.

Morte. 5 dias depois sem lesão. Sangue coração esteril

Cob. IV Inj. com agua de lavagem do pulmão e figado. (Viva) FEMEA.

Cob. IIIa. MACHO. + Cob. IV. FEMEA.

1o. Parto 29-9-27

2o. Parto 8-12-27

ob. morta 5 dias apos. *Zona de caseif. e necros. no figad. Hemor. infart. pulmo. Gang. epi. augment.* Ausencia de bac. ac. alc. resist. Inoc. de um frag. do gang. em 1 cobaya.

Cancro 12 dias depois da inoculação que se conservou aberto durante 1 mez. Ausencia de bacillos acido-alcool-resistentes. Conserva-se viva.

Duas cob. *Poliad. ingui. Morte de ambas* em Maio de 1928. CACHEXIA. Ausencia de lesão tuberculosa e de bacillos acido-alcool-resistentes.

A + B

1o parto (14-9-27) COB. morta 15 dias apos ter nascido. INFARCTUS PULMONAR.—HEMORRHAGIA CAPILLAR DO PULMÃO ZONA DE NECROSE NO FIGADO. Ausencia de bacillos acido-alcool-resistentes.

Cob. Inj. no peritoneo MACHO.—A 5 c.c. do filtrado. (Viva)

2o parto † (8-12-27) 2 Cob. com aspecto normal. GANGLIO INGUINAL AUGMENTADO. Morte de 1 em 8-5-28 e de outra em 14-5-28. Ausensencia de lesão tuberculosa e de bacillos.

A criança falleceu a 25 de Dezembro. O peso tomado durante o periodo de vida foi o seguinte:

Peso inicial – 31 de Out.: 1310 grs.
12 de Nov.: 1300 «
22 de Nov.: 1400 »
3 de Dez.: 1490 »
9 de Dez.: 1440 «
20 de Dez.: 1170 «

Nos ultimos cinco dias de vida a perda de peso foi rapida, sem nenhum phenomeno especial morbido que pudesse explicar não só a perda de peso como a causa da morte.

Por autopsia nada de anormal se encontrou, salvo uma pequena hypertrophia dos ganglios mesentericos.

Com fragmentos de visceras procederam á inoculação de cobayas que se conservaram em saude. Os ganglios mesentericos mostraram por esfregaços a presença de bacillos acido-alcool-resistentes. *A inoculação do filtrado de emulsão destes ganglios em cobayas determinou a morte dos animaes inoculados por cachexia, apresentando bacillos acido-alcool-resistentes em seus ganglios.*

As observações de CALMETTE, VALTIS e LACOMME (12) permittiram a estes sabios a seguinte conclusão:

"No curso de certas affecções tuberculosas graves, a passagem do virus tuberculoso da mãe ao féto, durante a gestação, póde se produzir menos excepcionalmente do que se acreditara até aqui: A infecção tuberculosa transplacentaria as mais das vezes é realizada por elementos invisiveis ao microscopio, filtraveis através vélas de porcellana porosa".

Posteriormente, ainda CALMETTE e seus collaboradores apresentam á Academie des Sciences (12) as seguintes conclusões:

"Esta infecção transplacentaria apresenta caracteres muito particulares, diversos da infecção realisada pela transmissão directa das fórmas normaes do bacillo de KOCH, de modo que se é levado a distinguir a herança bacillar propriamente dita, que é rara, da infecção transplacentaria pelo ultra-virus, que pelo contrario é muito frequente e que quando não determina a morte rapida do féto, ou do recem-nascido por desnutrição progressiva, não parece trazer consequencias graves para a saude dos lactentes, desde que não sejam estes expostos ás reinfecções bacillares no meio familiar".

Conclusões analogas ainda que ampliadas foram apresentadas por CALMETTE (13) á VI Conférence Internationale de Tuberculose.

* * *

A acção pathogenica dos elementos filtraveis do virus tuberculoso acha-se sobejamente demonstrada. E a possivel passagem destes elementos através a placenta fornece a chave do intrincado problema da herança morbida na tuberculose.

Ainda ahi a observação clinica condiz com a observação experimental. Encontra-se forte analogia entre os quadros morbidos determinados pela inoculação experimental destes elementos e o que representa a noção

antiga da pretuberculose, do temperamento lymphatico, do terreno predisposto.

Desde os meus primeiros trabalhos em 1910 (1) aos de VAUDREMER em 1921 (14) de VAUDREMER e de seus collaboradores (15, 16, 17, 18) nos annos seguintes, até os mais recentes, dos AA. anteriormente citados, se reconhece que a infecção determinada pelos elementos filtraveis do virus aberra da forma classica da infecção tuberculosa, caracterisando-se principalmente por um quadro clinico distrophico, que é o mais commum, cachectisante, e que em 8 a 10 o/o dos animaes inoculados, segundo MALARTRE (19), ou que na relação de 3 o/o, segundo CALMETTE (13), evolue para a forma classica.

ARLOING, DUFOURT e MALARTRE (19) traçaram nitidamente as caracteristicas dessas formas, classificando-as em fórma nodular, a mais rara, fórma cachectisante, a mais commum, e fórma ephemera curavel, sómente reconhecivel esta ultima, pela reacção allergica fugaz, posta em evidencia pela tuberculina.

Abre-se assim uma nova via de experimentação para a elucidação da immunidade relativa dos filhos de tuberculosos, que se traduz pela maior resistencia á evolução não só do virus como da doença, creando os estados escrofulosos, ou chronicos da fórma classica da infecção.

As experiencias de BOQUET, NEGRE, VALTIS (20), de MAC JUNKIN (21) PARAF (22), de ARLOING, THEVENOT, DUFOURT e MALARTRE (23), permittem concluir em um certo gráo de resistencia conferido ao organismo da cobaya por inoculação dos elementos filtraveis do virus, á uma infecção posterior virulenta pela forma acido-alcool-resistente.

Em apoio a esta interpretação fallam ainda a experimentação de VAN BENEDEN (24) obtendo na cobaya o phenomeno de KOCH em virtude de duas inoculações de ultra-virus tuberculoso, contido em dous vehiculos differentes (filtrado do derrame pleuritico, filtrado de expectoração), e a de VALTIS, SAENZ e MONALDI (25) que confirmam as experiencias de DEBRE, LELONG e BONNET (26).

É de prevêr pois que: *a vaccinação dos filhos de tuberculosos se possa estabelecer, por condições ainda não determinadas, de dóses vaccinantes repetidas, nas fórmas ephemeras ou curaveis da infecção transplacentaria, pelos elementos filtraveis do virus.*

* * *

Em Outubro de 1927, tive opportunidade de, perante o 1º Congresso Pan-Americano de Tuberculose, reunido em Cordoba, communicar as primeiras conclusões da serie experimental que expuz na primeira parte deste trabalho.

Podem em minha opinião ser interpretados os factos experimentaes observados como devidos á acção dos elementos filtraveis do virus tuberculoso, os quaes exerceram seu poder morbigeno, determinando a morte da primeira cobaya por cachexia. Reinoculado no segundo animal, o virus determinou a formação do cancro no ponto de inoculação (*o que está em opposição á observação geral sobre a acção pathogenica do virus*), com regeneração de formas acido-alcool-resistentes.

As fórmas acido-alcool-resistentes foram reabsorvidas, mas o ganglio satellite, transplantado para outra cobava, *produziu, em duas passagens successivas, a morte do animal em 5 dias.*

Por outro lado, o poder morbigeno do virus se manifestou, uma vez em primeira passagem, outra vez em segunda passagem no organismo materno, e, em *terceira passagem no organismo dos fétos*, os quaes apresentaram sempre lesões identicas: infarctos pulmonares, hemorrhagias capillares do pulmão, necrose e caseificação do figado, polyadenia e cachexia.

Em um caso, em quarta passagem houve formação de um cancro typico, que cicatrizou no fim de 1 mez. *Em nenhum caso foi encontrado o elemento virulento sob a fórma de bacillo acido-alcool-resistente.*

Tudo se passou nesta experimentação como se uma infecção latente minasse a resistencia organica, por perturbações funccionaes perennes, produzindo a formação de lesões que puderam ser verificadas.

Este estado discrasico era transmissivel da mãe ao feto, affirmando assim a noção de *herança morbida*. Da serie experimental acima mencionada, resulta ainda o facto interessante de ter sido o virus tuberculoso, reconhecivel pela fórma acido-alcool-resistente, encontrado sómente naquelles casos em que a infecção pelos elementos filtraveis fôra obtida por inoculação directa do virus.

Nos casos em que interveio o phenomeno biologico da herança, esta só se manifestou pelo poder morbigeno, com as alterações funccionaes e anatomicas delle decorrentes, sem que o elemento *figurado* etiologico pudesse ser evidenciado.

Esta observação mostra que *mesmo nos casos em que a passagem do elemento figurado do virus tuberculoso* (bacillo acido-alcool-resistente) *da mãe ao feto não se realise, a herança morbida se dá.*

Estabeleceremos assim a noção do pathenergogeno, isto é da *energia morbigena* immanente á materia heterologa, e que no caso actual se dissocia da noção de ultra-virus, considerado este como uma phase metacyclica germinal do virus tuberculoso, ou da fórma granular deste virus, interpretada por mim como phase integralisadora, biogenica, no cyclo vital do bacillo de KOCH.

Ao elemento morbigeno que acompanha o virus tuberculoso, que não é cultivavel *in vitro*, nem revelavel morphicamente *in vivo*, mas que é transmissivel em serie experimental por inoculação directa, ou por passagem natural através da placenta, reconhecivel só pelos seus effeitos e que se caracterisa ainda pela continuação destes mesmos caracteres, eu considero responsavel pela herança morbida na infecção tuberculosa e denomino de *pathenergogeno.*

CONCLUSÕES.

O legado morbido da mãe ao féto se realisa na infecção tuberculosa por via placentaria, permittindo nos casos mais raros, a evolução do agente etiologico até a fórma classica conhecida, representada pelo bastonete acido-alcool-resistente; transmittindo a potencialidade de evolução deste agente, reconhecivel através de passagens subsequentes em organismos

sensiveis, em casos mais frequentes, e conferindo em casos muito mais numerosos, uma doença tuberculosa atypica, que se manifesta por alterações do systhema lymphatico, taes como micro-polyadenia, hyperplasia dos ganglios, por infarctos e hemorrhagias capillares, por alterações necroticas dos tecidos e das visceras, e por profunda perturbação do metabolismo nutritivo, que póde attingir ao extremo gráo de determinar a morte.

As lesões e perturbações funccionaes que caracterisam a molestia tuberculose atypica foram encontradas por todos os investigadores que se tem preoccupado com o assumpto, mesmo por aquelles que concluem pela não existencia da fórma filtravel do virus, interpretando-as como produzidas por acção toxica.

Esta interpretação não póde ser mantida em virtude do facto que estas lesões são transmissiveis por inoculação em serie e que elles se repetem mesmo quando o elemento pathogenico provem de um organismo que o recebera por legado materno transplancetario (FONTES) (27).

Na infecção tuberculosa se dá, pois, o heredo-contagio e a herança morbida que d'elle deriva.

BIBLIOGRAPHIA

1—FONTES, A.—Memorias do Inst. Osw. Cruz. T. 2—1910.

2—CALMETTE, VALTIS, NEGRE et BOQUET—C. R. Ac. Sc. T. 181 pag. 491 – 1925.

3—ARLOING et DUFOURT—C. R. Ac. Sc. T. 181, pag. 826—1925. Bul. Ac. Med. T. 96, pg. 301—1926.

4—CALMETTE, VALTIS et LACOMME—C. R. Ac. Sc. T. 183, pg. 835 – 1926.

5—SERGENT, DURANT et BENDA—Bul. Ac. Med.—7 Dez. 1926.

6—COUVELAIRE—Presse Médicale 19 Fevrier. 1926.

7—MOENKEBERG, ONETTO e VERGARA—1º. Cong. Pan-Amer. de Tuberculosis.
Cordoba Out. 1927. R. Arg.

8—SADAOMI NISHIMOTO – Ref. of the Japan—Med. World. Vol. VII n. 9 Sept. 15. 1927.

9—IVO NASSO—Le Riforma Medica n. 51 Dec. 1927.

10—VAN BENEDEN—Brux. Med. pg. 1493 – 1927.

11—LYDIA RABINOVITSCH KEMPNER – Deut. Med. Woch. Nov. 1927.

12—CALMETTE, VALTIS et LACOMME – Presse Méd. 10 Nov. 1926. – C. R. Acd. de Sc. 186—18 Juin. 1928.

13—CALMETTE,—Rapport à la VI Conf. Int. de la Tuberc.
Bul. de l'Inst. Pasteur. T. XXVI n. 20 pg. 889.

14—VAUDREMER – C. R. Soc. Biol. T. 89, pg. 80.

15—HAUDUROY et VAUDREMER—C. R. Sc. Biol. T. 89, pg. 1276.

16—VAUDREMER—Bul. Ac. Méd. T. 95, pg. 440. 1926.

17—VAUDREMER – Le Bacille Tuberculeux 1 vol. Presses Universitaires – 1927.

18—VAUDREMER, PUTHOMME et PAULIN – Bul. Ac. Méd. T. 97, pg. 202—1927.

19—MALARTRE—Thèse de Lyon.—Apud. HAUDUROY—Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes.—1 vol. Masson & Cia. 1929.
20—BOQUET, NÈGRE et VALTIS—C. R. Soc. Biol. T. 94 pag. 235—1926.
21—MAC JUNKIN—J. Exp. Med.—T. 33, 751.
22—PARAF—C. R. Soc. Biol.—T. 92, 792.
23—ARLOING, THEVENOT, DUFOURT et MALARTRE—Ac. Méd. 11 Octo. 1927 pg. 208.
24—VAN BENEDEN—C. R. Soc. Biol. T. XCIX pg. 1560.
25—VALTIS, SAENS et MONALDI—B. R. Soc. Biol. T. XCIX pg. 1558.
26—DEBRÉ, LELONG et BONNET—C. R. Soc. Biol. T. XCV pg. 1425.
27—FONTES, A.—Communicação á VI Conferencia Internacional de Tuberculose, reunida em Roma Set. 1928.

ON HEREDO-INFECTION IN TUBERCULOSIS (1)

By Dr. A. FONTES

of the Oswaldo Cruz Institute, Official Relator of the Thema.

"Another very important point to be brought to light is that of tuberculous inheritance: nothing prevents the granulation from passing to the fetus, considering its proportions which are not an obstacle to its going through the filter".

". . . ,, the notion of tuberculizable ground is likely to be replaced, if not completely, at least in most of cases, by *that of tuberculosis in potential*".

A. FONTES (1910)

Mem. of the Inst. Osw. Cruz (1)

By heredo-infection in tuberculosis, we should uuderstand transmission of the tuberculous virus from the mother to the fetus, through the placenta, the placental tissue remaining untouched.

Then it is the transfer of the virus from the maternal organism to the organism of the fetus, under conditions of anatomical integrity of the tissue of the placenta, that characterizes the inheritance of the semen.

Heredo-infection is consequently a particular incidence of congenital contagion, which arises whenever there is a lesion in the vessels or in the tissues of the placenta, allowing direct passing through of the infectant element.

Both cases may be comprised under the generic name of heredo-contagion.

Most different is thus, the bio-pathologic conceit here established, from the mere biologic conceit of inheritance, in which the fundamental notion of transmission to offspring interferes, by way of intime changes of the generating elements, of ancestral characters which are being kept with their specific aspect in the evolution of the brood.

The possibility of transmission of the tuberculous vtrus, from the mother to the fetus, during intra-uterine life, should be then studied, keeping in mind the theory of heredo-contagion, quite independent of morbid phenomenons likely to establish the possibility of direct pnssing of the virus.

In this second case, then, it will mean intra-uterine contagion owing to accidental cause; the case will be of inheritance of the semen by a pathologic condition inherent to the placenta; the virus will be found in most cases, in the fetal organism, under its visible, classical acid-fast ap-

(1) Memorial read before the 2nd Pan American Congress of Tuberculosis, held in Rio ed Janeiro from the 30th of June to 7th of July 1929.

pearance, and will be revealed, in morbid inheritance, by tuberculization of the child to be born.

In the first case, heredo-infection is provoked by osmotic exchanges of the feeding maternal and fetal fluids, blood and lymph, creating a condition, if not pathologic, at least miopragic, which may appear with varying stages, whose last modality is a specific change of the tuberculized tissues.

The special physionomy this type of infection bestow on the infected organism, under its slightest forms, is bound with the physiopathology of the *tuberculizable ground*, an expression which means in pathology the organic dyscrasia, specific of children from tuberculous parents.

In such cases, the infectious element cannot be made patent under its classical form of an acid-alcool-fast rod.

The morbigenous action of the virus in nevertheless made obvious in its effects: hyperplasia of the lymphatic system, weakness of the circulative function, nutritional changes consequent to instability of the endocrinous function, etc., etc, all morbid characters which may be confounded with those subject to being ascribed to toxical elements of durable action, and whose durability or persistence for a longer or shorter time, may cause them to determine a special morbid constitution approaching the conditions which nowadays are comprised under the word: pre-tuberculosis.

This is the meaning of the notion of inheritance of ground, which, besides, represents nothing else but tuberculous infection under a special weakened modality, which, with humoral changes, and the cellular physiopathology it determines, establishes the condition of instable allergy in the classical infection.

The notions of infection and intoxication are thus coinciding, owing to their identity of effects, which are observed not merely by functional changes, but also by appearing anatomical alterations.

Tuberculous infection demonstrates what has been told by occasion of studying the filtrable virus.

In such cases, where the presence of KOCH's bacillus cannot be made obvious, that is, of the acid-alcohol-fast form of the virus), the morbid frame shows itself, experimentally, comparable with those revealed by clinic.

In my opinion, the hypothesis of infection and intoxication, under such circumstances, not only are not adverse, but even complementary one to other. The demonstrations of the morbigenous capacity of the virus may be made, in infection, by its durability and its permanency, whereas, in intoxication, this property is transient.

It is, accordingly, in the condition of continuity of the morbigenous action, that reside the characteristic of the filtrable elements of the virus, subject to maintain a condition of chronical intoxication and to be transmitted, in experimental series, by inoculation, or in natural series, by passage through the placenta, from the mother to the fetus.

In some cases, these filtrable elements of the tuberculous virus may reproduce the acid-alcohol-resistent form, with or without its pathologic sequence, provoking, however, always an instable allergic condition, which

may lead, either to hypersensibility, or to a greater resistence against the morbigenous action of the virus.

Thus remains explained that a particular condition of the humoral constitution may be created, that gives the case special physionomy of pretubercular state, under the prevailing conceit; but this state, which finds as its pathogenic factor, the chronical intoxication caused by the virus, is maintained only by the same factor with the permanency of the infection. Accordingly, the physio-pathologic action of tuberculous venoms, is shown by the action of the substances elaborated by the virus, either it be exercised on the noble elements of the tissue, specially of the lymphatic tissue, bringing changes into its anatomical constitution, or on the hemo-poietic system, subject to similar changes, or even causing troubles in the general nutriment, for the action of these venoms is always suffered by the endocrinic and neuro-vascular systems, on which repose, in the present state of knowledge, the automatism of the functions wich regulate somatic life.

The relations thus established between the ground and the virus, grow daily more favorable to the outburst of the tuberculous disease, which in fact, is already existing insidiously.

The morbigenous power of the virus counterweighed by the defence reaction, creates an allergic condition, a special state which may be compared to the particular state of the cellular irritableness, determined by the toxical tendency; it gives way to a condition of specific hypersensibility, whose exhaustment leaves plain field to the anaphylactic blow to take place. From the instable humoral equilibrium established by the cellular defence against the attack of the poisons of the virus, results the humoral condition of the *pre-disposition* to tuberculosis; from the peculiar cellular condition deriving from this chronical intoxication, decurs the appearance of the *tuberculizable ground.*

The somatic notion resulting from both factors, establishes the clinical frame of *pre-tuberculosis*, the true term under the anatomical and etiologic points of view, but wrong if considered physio-pathologically, for, in such morbid states, infection already exists, for which the stage, we might say, the sarcodial, ultra-microscopical, invisible (ultra-virus) or visible granular or pre-bacterian stage, must account.

* * *

Going further in the study of the filtrable forms of tuberculosis, I effected, in November 1926, the following series of experiments.

Tuberculus sputum emulsioned in a saline solution, was filtered upon a CHAMBERLAND device L2, after a stage of three days in the dry-oven at 37°C. The perfect state of the filter was verified by means of smearings of the filtrate obtained on slanting gelose and in plain glycerine broth. The smeared media, maintained either in the dry-oven or at the laboratory's temperature remained sterile.

With such filtrate, I injected :

Sub-cutaneously (10 c.c. of the filtrate)—Guinea pig No. 1 (male).
« « (10 c.c. of the filtrate)—Guinea pig No. 2 (female).
Intra-peritoneally (5 c.c. of the filtrate)—Guinea pig No. 3 (male).

On the 28th February 1927, the Guinea pig No. 1 died, cachectic.

Autopsy showed absence of specific changes and of acid-alcohol-fast bacilli. In the lung we found infarcts and capillar hemorrhages. An examination of cuts of the liver, spleen and ganglia as also of the lesions found in the lungs did not reveal the presence of specific changes or of acid-alcohol-fast bacilli.

With the material obtained from this animal, I effected inoculations to a following series:

Guinea pig No. I — Injected sub-cutaneously with pulp of spleen.
Guinea pig No. II — idem, idem, with fragments of lung.
Guinea pig No. III — idem, idem, with fragments of epiploon.
Guinea pig No. IV — (female) — Injected with the water used for washing the lung and liver.

20. 2. 27.—The Guinea pig No. I dies from an interfering cause. The autopsy did not show specific lesions nor acid-alcohol-fast bacilli.

24. 2. 27.—Gu. pig. No. III dies.—Autopsy revealed increased epiploic ganglia. No specific lesions. In the epiploic ganglia, acid-alcohol-fast granulations were discovered. No trace of acid-alcohol-fast bacilli either in viscera or in the other ganglia.

The material from this animal (epipoic ganglia) was used to inject a Gu. pig IIIA (male).

On 28. 2. 27. Gu. pig II dies. Examination gave results quite identical to that observed in Gu. pig I.

The Guinea pig IIIA (male) which had been inoculated on the 24. 2. 27 with material proceeding from Gu. pig III, showed, after 8 days, an abscess at the inoculation spot, which bursting out, turned to an ulceration with the appearance of a chancre. Preparations made with rubbings of the rands of this chancre, revealed the presence of acid-alcohol-fast bacilli.

The inguinal ganglion, satellite of the ulceration, showed increase in volume. After one month, the ulceration was cicatrized.

28. 4. 28, this Guinea pig died. The autopsy showed no tuberculous lesions. Pulmonar infarcts; presence of acid-alcohol-fast bacilli, of granular shape in the tracheo-bronchial ganglia.

The ganglion, satellite of the chancre, was extirpated. Examination of cut and rubbings did not show cheesy degeneration nor acid-alcohol-fast bacilli.

The remainder of the material was injected under the skin of another Guinea pig.

This latter died 5 days later, without any lesion or without apparent cause; smearings made with the blood of the heart remained sterile.

The same ganglion of this animal was transplanted to another one, by the same technique.

This animal died after 3 days, and like the former Guinea pig, did not show any apparent lesion nor germs in the heart blood.

Guinea pig IV (female), injected on the 18. 2. 27 and which lived together with the male III, from the 24 2. 27, brought forth on the 29. 9. 27 a young one, which died after 5 days. Autopsy revealed a zone of cheesy degeneration and necrosis in the liver, hemorrhages and infarcts in the lungs and increased volume of epiploic ganglia. No acid-alcohol-fast bacilli.

A small piece of an epiploic ganglion was inoculated sub-cutaneously to another Guinea pig. After 12 days, this latter showed a chancre beginning to form, through ulceration of the injected spot. The formed chancre kept open for one month. No acid-alcohol-fast bacilli were found within this lesion. The chancre cicatrized, and the animal is still alive, without the aspect of tuberculous, but rather exceedingly fat (actual weight 980 grams).

On the 8. 12. 27, two more young ones were born, which died in May of 1928, without tuberculous lesions and without bacilli, but showing very marked inguinal polyadenia.

The Guinea pigs 2 (female) and 3 (male) procreated also. The first young one was born on the 14. 9. 27 and died after 15 days. The autopsy revealed pulmonar infarcts, capillar hemorrhages in the lungs and a necrotic zone in the liver. No acid-alcohol-fast bacilli.

On the 8. 2. 27, two more young ones were born, of a normal appearance, but with the ganglia increased. One died on the 8. 5. 28, the other one on the 14. 5. 28. Both showed neither tuberculous lesions nor bacilli.

The following synoptic table will give a more approaching idea of the decurring of of the process and the observations about the experimental series as described hereabove:

* * *

Foreign experiments generally confirm the conclusions I was led to, which will be exposed in a further part of the present work.

Since the fundamental communications of CALMETTE, VALTIS, NEGRE, BOQUET (2), F. ARLOING and DUFOURT (3) numerous works, published in the course of these last few years, have confirmed the possibility of the tuberculous virus passing through the mother's placenta and causing infection to the fetus.

CALMETTE, VALTIS and LACOMME (4), SERGENT, DURAND and BENDA (5), COUVELAIRE (6) in France, MOENKEBERG, ONETTO and VERGARA (7) in Chile, NISHIMOTO (8) in Japan, NASSO (9) in Italy, VAN BENEDEN (10) in Belgium, LYDIA RABINOWITSCH (11) in Germany, all of them bring an ample contribution of documents to the bio-pathologic phenomenon of the heredo-contagion in tuberculosis. And from the experiments afforded, results that contagion is caused without any dependence on lesion of the placenta, thus being fully justified the meaning of the expression *Inheritance of semen*, biologically speaking.

Clinical observation brings also a wide documentation to the said phenomenon.

ARLOING and DUFOURT (3) in 1926, report the following case to the Paris Academy of Medicine:

Early birth on the 7th month, from tuberculous mother with advanced pulmonar lesions, on the 31st October 1925. Fetus weighs 1,310 gram; placenta weighs 310 gs.

Immediately after the birth, the baby is taken off from mother and brought up in the *couveuse*.

Somatic examination of the baby reveals nothing. Temperature oscillates between 34°,2 and 35°C. On 9th November, temperature reaches at 37° and keeps unchanged until the last days of life.

Gu. pig inoc. subcutan (2) 10 c.c. of filtrate

1) *Death.* (18. 2. 27) CACHEXY. Autop. absence of specific lesions and of alc. ac. fast bacilli INFARCT and PULMONAR HEMORRHAGES. Material extracted for further inoculation.

FEMALE B

2) Alive

Gu. pig I inoc. pulp of spleen → *Death* 20. 2. 27. Interfering cause. Absence of specific lesions and of acid-alcohol-fast bacilli.

Gu. pig II Inj. pulp of lung. *Death* 28. 2. 27 Idem Idem Gu. p. I.

Gu. pig III Inj. with fragm. of epiploon. → *Death* 24. 2. 27. GANGLION, EPIPLOON INCREASED. PRESENCE OF ACID-ALCOHOL-FAST GRANULATIONS. → Inoc. this material to 1 Gu. pig IIIa (MALE)

Gu. pig IIIa. *After 8 days, abscess and formation of chancre.* IN THE LESION, PRESENCE OF ACID-ALCOHOL-FAST BACILLI. INGUINAL GANGLION INCREASED, ulcer cicatrized after one month. Ganglion extirpated. No cheesy degeneration. No bacilli.

Gu. pig IIIa. *Death* 28. 4. 28. Absence of tuberculous lesions. CACHEXY. PULMONAR INFARCT. PRESENCE OF ACID-ALCOHOL-FAST BACILLI and of granulous form (Tracheo-bronchic ganglia)

Ganglion inoculated subcutaneously to a Guinea pig. → *Dies 5 days later* without lesion. Heart blood sterile. This same blood is passed to another Guinea pig. → *Dies 5 days later* without lesion. Heart blood sterile.

Gu. pig IV Inj. with water used for washing lung and liver. (Alive) FEMALE. → Gu. p. IIIa. MALE. + Gu. p. IV. FEMALE.

First birth 29. 9. 27. → Gu. p. dies 5 days later. *Zone of cheesy degeneration and necrosis in liver. Hemorrh. Pulm. Infarct. Epip. gangl. increased.* No acid-alcohol-fast bacilli. A frag. of the gang. is inoc. to a Guinea pig. → *Chancre after 12 days*, remaining open for one month. No acid-alcohol-fast bacilli. Still alive.

Second birth 8. 12. 27 → 2 Gu. pig. *Inguinal polyaden. Both died* in May 1928. CACHEXY Neither tuberculous lesion nor acid-alcohol-fast bacilli.

Gu. pig inoculated intraperit. MALE.—A 5 c.c. of filtrate. (Alive)

A + B

First birth (14.9.27) → Gu. pig. died on its 15th day. PULMONAR INFARCT. — CAPILLAR HEMORRHAGE IN LUNG. NECROTIC ZONE IN LIVER. Absence of acid-alcohol-fast bacilli.

Second birth † (8. 12. 27) → 2 Gu. pigs with normal aspect. INGUINAL GANGLION INCREASED. One died 8. 5. 28, the other on 14. 5. 28. Absence of tuberculous lesions and of bacilli.

ON CHAMBERLAND BOUGIE N. L2 (19. II. 26).

The baby dies on the 25th December. These are the weights recorded during the period of life:

Weight when born — 31th October: 1,310 gram
12th November: 1,300 »
22nd November: 1,400 »
3rd December: 1,490 »
9th December: 1,440 »
20th December: 1,170 »

During the last 5 days of life, the decrease of weight was rapid, without appearing any special morbid phenomenon that could account as well for the loss of weight as for the causa mortis.

Autopsy revealed nothing abnormal, except a slight hypertrophy of the mesenterial ganglia.

With fragments of the viscera, several inoculations were effected on Guinea pigs, which all kept in good condition of health. Rubbings from the mesenterial ganglia revealed presence of acid-alcohol-fast bacilli. *The inoculation of the filtrate of an emulsion of these ganglia to Guinea pigs, determined the death of the inoculated animals by cachexy, their ganglia showing acid-alcohol-fast bacilli.*

CALMETTE, VALTIS and LACOMME's (12) observations enabled these celebrated investigators to draw the following conclusions:

"In the course of certain severe tuberculous affections, the passage of the tuberculous virus from the mother to the fetus, during pregnancy, may appear with less exception as was thought up to now: The transplacental tuberculous infection, is most often ascribable to elements microscopically invisible, but filtrable through earthen bougies".

Later on, CALMETTE and his co-workers, inform again the Academy of Sciences (12) of their conclusions as follows:

"This transplacental infection presents very peculiar and varied characters, of the infection obtained by direct transmission of the normal forms of the KOCH's bacillus, so that this may lead to distinguishing the proper bacillar inheritance, this being rare, from the transplacental infection by the ultra virus, which on the contrary, is most frequent, and when not determining the rapid death of the fetus, of the new-born child, by progressive disassimilation, does not appear to bring serious consequences for the health of the sucklings, since they are kept from bacillar reinfections in their family circle".

Similar conclusions, even developed, have been communicated by CALMETTE (13) to the VIth Conférence Internationale de Tuberculose.

* * *

The pathogenic action of the filtrable elements of the tuberculous virus is then exhaustively demonstrated. And the possible passing of these elements through the placenta furnishes us with a key to the complicated riddle about morbid inheritance in tuberculosis.

Still here clinic confirms experimental observation. A great similarity may be found between the morbid frames determined by experimental

inoculation of such elements, and that which represents the former notion of pre-tuberculosis, of lymphatic temperament, of predisposed ground.

Since my first works in 1910 (1) up to those of VAUDREMER in 1921 (14), of VAUDREMER and his co-workers, (15, 16, 17 and 18) in the following years, until the newest ones of the already named authors, one must recognize that the infection determined by the filtrable elements of the virus, is different from the classical tuberculous infection, whose character is chiefly a dystrophic clinical frame, alias the commonest, and causing cachexy, and that, in 8 to 10 o/o of injected animals, according to MALARTRE (19), or a percentage of 3, according to CALMETTE (13) such infection evolves toward the classical form.

ARLOING, DUFOURT and MALARTRE (19) have given a clear exposition of the characters of these forms, and classify them in nodular type, the rarest, cachectic type, the commonest, and an ephemeral curable type, this latter only able to be detected, owing to the transient allergic reaction, revealed by the tuberculin test.

Thus a new field to experiments is open for investigating and determine a relative immunisation of children from tuberculous parents, which would mean a greater resistence to evolution, not only of the virus as also of the disease, creating scrofulous or chronical conditions of the classical forms of the infection.

From the experiences of BOQUET, NEGRE and VALTIS (20) of MAC JUNKIN (21) PARAF (22), of ARLOING, THEVENOT, DUFOURT and MALARTRE (22), we are authorized to conclude to the fact of a certain grade of resistence being bestowed upon the organism of the Guinea pig by the inoculation of the filtrable elements of the virus, to a later virulent infection by the acid-alcohol-fast form.

To support this explanation, there are besides VAN BENEDEN's experiment (24), who obtained in a Guinea pig the phenomenon of KOCH, in consequence of two inoculations of tuberculous extra virus, obtained in two different stuffs (filtrate of pleuretic outspill, filtrate of sputum) and those of VALTIS, SAENZ and MONALDI (25), which also are a confirmation of DEBRE, LELONG and BONNET's (26).

Then, it can be foreseen that: *vaccination of children from tuberculous parents, may be effective, under still undetermined conditions of vaccination dosis renewed in transient or curable forms of the transplancetal infection, by the filtrable elements of the virus.*

* * *

In October 1927, I had an apportunity to report to the First Pan-American Congress of Tuberculosis, held in Cordoba, the first conclusions of the series of experiments, which I detailedly exposed in the first part of the present work.

My opinion is that the experimental facts I observed may be explained as ascribable to the action of the filtrable elements of the tuberculous virus, the same exercising their morbigenous power, provoking the death of the first Guinea pig by cachexy. Inoculated anew to a second animal, the virus determined the formation of a chancre at the inoculation spot

(which contradicts the general observation upon the pathogenic action of the virus), with the regeneration of acid-alcohol-fast forms.

The acid-alcohol-fast forms were re-absorbed. but the satellite ganglion, transported to another Guinea pig, *caused, by two consequent passages, the death of the animal after 5 days.*

On the other part, the morbigenous power of the virus showed itself, once in a first passage, another time in a second passage in the maternal organism, and *after a third passage* in the organism of the fetus, in which always identical lesions were visible: pulmonar infarcts, pulmonar capillar hemorrhages, necrosis and cheesy degeneration of liver, polyadenia and cachexy.

In one case, by a fourth passage, a typical chancre was formed, which cicatrized after one month. *In no incidence was the virulent element found under the shape of acid-alcohol-fast bacillus.*

Everything, in this experimentation happened as if some latent infection were ruining little by little the organic resistence, through lasting functional troubles, which led to the formation of lesions which were easily verified.

This dyscrasic condition was transmissible from the mother to the fetus, thus giving a new confirmation of the notion of *morbid inheritance.* Still an interesting fact results also from the experimental series above referred to, that of having been the tuberculous virus, characterized by the acid-alcohol-fast form, discovered only in such cases, where the infection by the filtrable elements was got at by direct inoculation of the virus.

In cases, where the biologic phenomenon of inheritance interfered, this latter was made patent only by morbigenous power, with the decurring functional and anatomic troubles, without being possible to bring into evidence the *figurative* etiologic element.

This observation demonstrates that *even in cases where the passage of the figurative element of the tuberculous virus* (acid-alcohol-fast bacillus) *from the mother to the fetus* does not effect itself, *the morbid inheritance is made obvious.*

We shall thus have established the notion of pathenergogen, that is to say, of the *morbigenous energy* pertaining to heterologous stuff, and which in the present case is to be dissociated from the notion of ultra virus, this latter being considered as a metacyclic stage of germination of the tuberculous virus, or of the granular form of this virus, which to gather represent an integralizating, biogenic stage in the vital cycle of the KOCH's bacillus.

I consider as the responsible for morbid inheritance in tubercular infection, the morbigenous element accompanying the tuberculous virus, which is not cultivable *in vitro*, nor morphically revealable *in vivo*, but is likely to be transmitted in experimental series by direct inoculation, or by natural passing through the placenta, is droved to exist only by its effects and is also characterized by continuation of these same properties. This is what I called: *pathernegogen.*

CONCLUSIONS

The morbid inheritance from mother to fetus, takes place, in the tubercular infection, by the placenta, allowing in certain most unfrequent cases, the evolution of the etiologic agent up to the known classical form, represented by the acid-alcohol-fast rod; transmitting the potentiality of evolution of this factor, made patent through subsequent passages to sensible organisms, in less rare cases, and bestowing, in much more numerous cases, an atypical tuberculous illness, whose symptoms are changes in the lymphatic system, such as micro-polyadenia, hyperplasia of the ganglia, through infarcts and capillar hemorrhages, necrotic changes in tissues and viscera, and through a deep perturbation of the feeding metabolism which may attain to the extreme degree of causing death.

The functional changes and perturbations, which are characteristics of the atypical tuberculous disease, have been observed by all investigators who have undertaken the problem, even by those who have been led to deny the existence of the filtrable form of the virus, and who considered these symptoms as being the results of a toxical action.

This explanation cannot hold in the case, owing to the fact of these lesions being transmissible by consecutive inoculations, and of they appearing repeatedly, even when the pathogenic element is supplied by an orgaganism to which it was passed through the placenta, as a maternal inheritance (FONTES) (27).

In tuberculous infection, then, there happens heredo-contagion togethe r with the decurrent morbid inheritance.

BIBLIOGRAPHY

1—FONTES, A.—Memorias do Inst. Osw. Cruz. T. 2—1910.

2—CALMETTE, VALTIS, NEGRE et BOQUET—C. R. Ac. Sc. T. 181 pag. 491 – 1925.

3—ARLOING et DUFOURT—C. R. Ac. Sc. T. 181, pag. 826—1925. Bul. Ac. Med. T. 96, pg. 301—1926.

4—CALMETTE, VALTIS et LACOMME—C. R. Ac. Sc. T. 183, pg. 835 – 1926.

5—SERGENT, DURANT et BENDA—Bul. Ac. Med.—7 Dez. 1926.

6—COUVELAIRE—Presse Médicale 19 Fevrier. 1926.

7—MOENKEBERG, ONETTO e VERGARA —1º. Cong. Pan-Amer. de Tuberculosis.
Cordoba Out. 1927. R. Arg.

8—SADAOMI NISHIMOTO – Ref. of the Japan—Med. World. Vol. VII n. 9 Sept. 15. 1927.

9—IVO NASSO—Le Riforma Medica n. 51 Dec. 1927.

10—VAN BENEDEN—Brux. Med. pg. 1493 – 1927.

11—LYDIA RABINOVITSCH KEMPNER – Deut. Med. Woch. Nov. 1927.

12—CALMETTE, VALTIS et LACOMME – Presse Méd. 10 Nov. 1926. – C. R. Acd. de Sc. 186—18 Juin. 1928.

13—CALMETTE,—Rapport à la VI Conf. Int. de la Tuberc.
Bul. de l'Inst. Pasteur. T. XXVI n. 20 pg. 889.

14—VAUDREMER – C. R. Soc. Biol. T. 89, pg. 80.

15—HAUDUROY et VAUDREMER—C. R. Sc. Biol. T. 89, pg. 1276.
16—VAUDREMER—Bul. Ac. Méd. T. 95, pg. 440. 1926.
17—VAUDREMER — Le Bacille Tuberculeux 1 vol. Presses Universitaires — 1927.
18—VAUDREMER, PUTHOMME et PAULIN — Bul. Ac. Méd. T. 97, pg. 202—1927.
19—MALARTRE—Thèse de Lyon.—Apud. HAUDUROY—Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes.—1 vol. Masson & Cia. 1929.
20—BOQUET, NÈGRE et VALTIS—C. R. Soc. Biol. T. 94 pag. 235—1926.
21—MAC JUNKIN—J. Exp. Med.—T. 33, 751.
22—PARAF—C. R. Soc. Biol.—T. 92, 792.
23—ARLOING, THEVENOT, DUFOURT et MALARTRE—Ac. Méd. 11 Octo. 1927 pg. 208.
24—VAN BENEDEN—C. R. Soc. Biol. T. XCIX pg. 1500.
25—VALTIS, SAENS et MONALDI—B. R. Soc. Biol. T. XCIX pg. 1558.
26—DEBRÉ, LELONG et BONNET—C. R. Soc. Biol. T. XCV pg. 1425.
27—FONTES, A. — Communicação á VI Conferencia Internacional de Tuberculose, reunida em Roma Set. 1928.

Infecção do AEDES AEGYPTI macho e possibilidade da propagação da febre amarella de STEGOMYIA a STEGOMYIA sem passagem pelo homem

Pelo Dr. HENRIQUE de BEAUREPAIRE ARAGÃO

Chefe de Serviço

No decurso de nossas experiencias a respeito da febre amarella experimental procurámos verificar si era possivel infectar o *Aedes ægypti* macho com o virus. Como os machos não picam, recorremos, para alimental-os, á sangue desfibrinado de *rhesus* infectado, ao qual addicionavamos um pouco de mel (5 o/o) para tornal-o mais procurado pelo mosquito. Com o sangue assim preparado embebe-se um pequeno tampão de algodão que se colloca na gaiola em que estão os machos *Aedes ægypti*. Estes não tardam a sugar o sangue, não se enchendo, porém, demasiadamente, como ás vezes acontece ás femeas, devido ao seu tubo digestivo ser de menor capacidade e terem menos necessidade de alimento do que aquellas. Depois do primeiro repasto infectante, os mosquitos foram alimentados a mel até o momento da verificação da infecção que foi feita 14 a 16 dias depois.

Até agora, foram feitas 5 experiencias com *Aedes ægypti* em taes condições, que são as seguintes:

EXPERIENCIA 1. *M. rhesus* n. 232. Inoculado em 24-12-28, por via subcutanea, com uma emulsão em agua distillada de 2 *Aedes ægypti*, que, 15 dias antes, tinham picado um *rhesus* infectado. Este macaco, cuja temperatura inicial foi de 38º,9, esteve 5 dias sem febre, no 6º dia apresentou 40º, no 7º 39º,9 e no 8º dia estava cahido na gaiola, com 36º pela manhã; foi sacrificado.

A autopsia revelou uma ictericia muito accentuada, como não occorre geralmente nos rhesus; figado extremamente amarello, baço grande e rins pouco alterados. O exame histo-pathologico não revelou, no figado, as lesões classicas de febre amarella e tão somente degeneração gordurosa.

O *rhesus* (n. 249), inoculado com 1 cc de sangue do *rhesus* 232, teve diversas reacções febris, que não foram devidas ao virus amarillico, porquanto inoculado ulteriormente com sangue virulento, teve uma febre amarella typica e morreu em 6 dias com lesões caracteristicas.

EXPERIENCIA 2. *M. rhesus* 412. Foi inoculado em 6-5-29 com uma emulsão de 9 *Aedes ægypti* machos que tinham sugado sangue de *rhesus* infectado nos dias 22 e 23 de Abril de 1929. Este macaco, cuja temperatura inicial era de 38º,9, teve 39º no dia 7; 39º6 no dia 8; 40º,6 no dia 9; 41º,2 no dia 10 e no dia 11 a temperatura pela manhã era de 35º,3 e á tarde 35º. O macaco estava cahido na gaiola e foi sacrificado.

Apresentava lesões macroscopicas typicas de febre amarella, e o exame histo-pathologico do figado, gentilmente feito pelo Dr. MAGARINOS TORRES, demonstrou a existencia de degeneração gordurosa e necrose das cellulas hepaticas e inclusões nucleares especificas.

EXPERIENCIA 3. *M. rhesus* 464. Inoculado em 10-6-29 com uma emulsão de 7 *Aedes ægypti* machos que tinham sugado sangue de *rhesus* infectado 403 em 28-5-29. Temperatura 39º. Dous dias depois temperatura de 39º9. E' sangrado. A temperatura mantem-se entre 39 e 39º,7 desde esse dia até 27-6-29. No dia 1-7-29, o macaco está morto na gaiola. Lesões macroscopicas bastante parecidas com as de febre amarella, e o exame microscopico as confirma, demonstrando intensa necrose e degeneração gordurosa das cellulas hepaticas e inclusões nucleares (M. TORRES).

EXPERIENCIA 4. *M. rhesus* 482. Inoculado no dia 27 com uma emulsão em agua distillada esteril de 2 *Aedes ægypti* que tinham sugado sangue do *rhesus* 408 no dia 28-5-29. Temperatura 38º,9. Até o dia 1º, o animal nada de mais apresenta. No dia 2-7-29, sua temperatura se eleva bruscamente a 40º,7 e no día seguinte o macaco apresenta-se com 37º,8. E' sacrificado apresentando lesões macroscopicas typicas que são confirmadas pelo exame histo-pathologico que revelou: leve degeneração gordurosa, infiltração de polymorphonucleares em pequenos fócos, inclusões nucleares especificas. Poucas cellulas hepaticas necrosadas (M. TORRES).

Estas 3 ultimas experiencias positivas não deixam duvida que é possivel infectar mosquitos machos, fazendo-os sugar sangue desfibrinado de um *rhesus* infectado. A seguir, fizemos mais as seguintes experiencias com o fim de elucidar se mosquitos machos, collocados com femeas infectadas na mesma gaiola, se infectavam e vice versa.

EXPERIENCIA 5. *M. rhesus* 426. Este macaco foi inoculado com uma emulsão de 7 *Stegomyias* qne estiveram com 10 *Aedes ægypti* femeas infectadas numa mesma gaiola de vidro modelo GODOY durante 12 dias. Temperatura em 20-5-29, dia da experiencia, 39º. Até o dia 28, poucas alterações. Neste dia, a temperatura do macaco se eleva a 40º e elle é sangrado. No dia 29 a temperatura cahe a 39º,6, nos dias 30 e 31 o animal tem 40º e 39º,9. Nos dias 1 e 2, 39º,3 e nos dias 3 e 4, 39º,8 e 40º,2. Dahi em deante a temperatura se normalisa, e afinal suspende-se a observação do animal em 13-6-29, tendo elle tido nos ultimos 10 dias, de 39 a 39º,4, salvo no dia 8 em que se elevou a 39º,9.

EXPERIENCIA 6. *M. rhesus* 442. Este macaco foi inoculado no dia 29-5-29 com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* 426, colhido no dia 28-5-29. Até o dia 8-6-29, a temperatura se mantem pouco elevada, nunca superior a 39º,7. No dia 9, o macaco apresenta bruscamente uma elevação thermica de 41º e no dia seguinte cahe a 36º,8. Elle é então sacrificado. O exame macroscopico das visceras revela lesões de febre amarella que são confirmadas pelo laudo do exame histo-pathologico que diz: congestão; necrose e degeneração gordurosa das cellulas hepaticas; desarranjo das traves de HENLE. Inclusões nucleares (M. TORRES).

Este resultado vem demonstrar que os mosquitos machos, que estiveram 12 dias com 10 femeas infectadas, estavam infectados, porquanto, inoculados em um *rhesus*, provocaram nesse uma molestia attenuada, como se verifica pelo resultado positivo da inoculação do sangue do *rhesus* 426 no de numero 442.

EXPERIENCIA 7. *M. rhesus* 483. Este macaco foi inoculado com uma emulsão de 4 *Aedes ægyptii* femeas que estiveram com *Aedes* machos desde 10-6-29 até 27-6-29, e que estavam seguramente infectados (Exp.

4). (Estes *Aedes* foram collocados juntos numa gaiola nova e limpa no dia 10-6-29, e ahi permaneceram até 27-6-29). A temperatura do macaco era de 39o no dia da inoculação. No dia 28 foi de 39°,1; no dia 29—39°,7; no dia 30—39°; a 1-7-29—39°,9; nos dias 2 e 3 de Julho, 39°; no dia 4—39°,6; no dia 5—40°; no dia 6—40°,9 e no dia 7, a temperatura cahe a 36°, sendo o animal sacrificado. O exame macroscopico das visceras daya todas as apparencias de febre amarella, e o exame histo-pathologico do figado revelou: degeneração gordurosa, necrose das cellulas hepaticas; desarranjo das traves de HENLE; inclusões nucleares. (M. TORRES).

Estas experiencias estabelecem a nosso vêr os seguintes factos:

1o) E' possivel infectar *Aedes aegyptii* macho com sangue desfibrinado do *rhesus* infectado.

2o) E' possivel infectar *Aedes ægyptii* machos collando-os juntamente com femeas infectadas.

3o) E' possivel infectar *Aedes ægyptii* femeas collocando-as juntamente com machos infectados.

Estes resultados parecem afirmar a possibilidade de uma infecção de mosquito o que, provavelmente não é frequente no estado normal, mas que serviria para explicar certos casos de febre amarella que occorrem ás vezes, num logar, muito tempo após o ultimo, e sem que, entre elles, se observem casos intermediarios.

On infection of the male "AEDES AEGYPTI" and the possibility of propagation of yellow fever from STEGOMYIA to STEGOMYIA without passage through man

By Dr. HENRIQUE de BEAUREPAIRE ARAGÃO

Chief of Service

In the course of our experiments with regard to experimental yellow fever, we tried to verify whether it was possible to infect the male *Aedes ægypti* with the virus. As males do not bite, we employed, to feed them, desfibrinated blood of infected *rhesus*, to which we added a little honey (5 o/o), to render it more attractive for the mosquito. With such prepared blood, a bit of cottonwool is humected and placed into the cage where the male *Aedes ægypti* are kept. These begin soon to suck the blood, though not absorbing exceedingly as female often use to do, for, their digestive tube is of a smaller capacity, and they do not require so much food as the latter. After this first infecting meal, the mosquitoes were fed on honey, until the moment of verifying the infection, which was carried out 14 to 16 days later.

Up to the present time, 5 experiments with *Aedes ægypti* were effected under such conditions, a report of which we give hereunder:

EXPERIMENT 1. *M. rhesus* N. 232. Inoculated on 24. 12. 28, subcutaneously, with an emulsion in distilled water, of 2 *Aedes ægypti*, which, 15 days before, had bitten an infected *rhesus*. This monkey, whose previous temperature was 38º9, remained without a fever for 5 days, showed 40º on the 6th, and 39º9 on the 7th day. On the 8th day, in the morning, it was found lying in its cage with 36º and killed. The autopsy revealed a very marked jaundice, such as seldom observed in *rhesus*, an extremely yellow liver, large spleen, little changes in kidneys. The histo-pathologic examination did not show, in the liver, the typical changes occurring in yellow fever, but merely fatty degeneration.

Rhesus N. 249 inoculated with 1 c.c. of the blood from *rhesus* 232, underwent several febrile reactions, for which, however, the virus of yellow fever was not liable, since after this monkey being later inoculated with virulent blood, it had a typical yellow fever and died after 6 days with the characteristical lesions.

EXPERIMENT 2. *M. rhesus* 412. Was inoculated on the 6th May with an emulsion made of 9 male *Aedes ægypti* that had sucked on the 22nd and 23rd April 1929, blood from an infected *rhesus*. This monkey, whose temperature, at the beginning, was 38º.9, showed 39º on the 7th; 39º.6 on the 8th; 40º.6 on the 9th; 40º.2 on the 10th May. On the 11th in the morning, temperature had sunk to 35º.3, and 35º at night. The monkey was lying in the cage and was killed.

It showed macroscopic changes, typical of yellow fever. The histopathologic examination, for which we are indebted to Dr. MAGARINOS TORRES' kindness, revealed fatty degeneration with necrosis in the hepatic cells, and the specific nuclear inclusions.

EXPERIMENT 3. *M. rhesus* 464. Inoculated on the 10. 6. 29 with an emulsion of 7 male *Aedes ægypti* which had sucked on the 28. 5. 29, blood of the infected *rhesus* 408. Temperature 39o. After two days, it had risen to 39o.9, being then the animal bled. Temperature keeps between 39o and 39o.7 from this date till on the 27th June. On the 1st July, the animal is found dead in its cage. Macroscopic lesions, rather similar to those of yellow fewer, same being confirmed by microscopic examination, which shows, besides, extensive necrosis and fatty degeneration of the liver cells, as also nuclear inclusions (M. TORRES).

EXPERIMENT 4. *M. rhesus* 482. Inoculated on the 27th with an emulsion, in sterile and distilled water of 2 *Aedes ægypti* which had sucked blood from *rhesus* 408 on the 28. 5. 29. Temperature 38o.9. No change in the animal until the 1st of July. On the 2nd, sudden rise of temperature to 40o.7, and on the next morning, it sinks back to 37o.8. Being killed, it shows macroscopically typical lesions, confirmed by histo-pathologic examination, which reveals, besides, a slight fatty degeneration, infiltration of polymorphonuclear leucocytes and nuclear inclusions. Few liver cells being necrosed (M. TORRES).

The last three positive experiments do not leave place to any doubt about the possibility of infecting male mosquitoes by putting them to suck disfibrinated blood from an infected *rhesus*.

We realized further experiments, with a view to elucidating the question whether male mosquitces, put together with infected females in the same cage, could get infected, or vice versa.

EXPERIMENT 5. *M. rhesus* 426. This monkey was inoculated with and emulsion of 7 *Stegomyiæ* which had remained in a glass cage of GODOY, for 12 days time, together with 10 infected females. Temperature on the 20. 5. 29 (date of the experiment), 39o. Up to the 28th, no noteworthy changes. By that day, the temperature of the animal rose to 40o, this being then bled out. On the 29th, temperature decreases to 39o.6. On the 30th and 31st, it shows 40o and 39o.9. On the 1st and 2nd, 39o.3 and on the 3rd and 4th, 39o.8 and 40o2. Henceforth, temperature is getting back to normal; the observation of the animal was given up on the 13. 6. 29, the same having shown, during the last 10 days, 39o to 39o.4, except on the 8th, when it rose to 39o.9.

EXPERIMENT 6. *M. rhesus* 442. The animal was inoculated on the 29. 5. 29 with 0,5 cc. blood from *rhesus* 425, gathered on the 28. 5. 29. Up to the 8. 6. 29, temperature remains about unchanged, never exceeding 39o.7. On the 9th, a sudden thermic rise to 41o, falling on the next morning to 36o.8. The animal is then sacrificed. The macroscopical examination reveals lesions of yellow fever, which the results of histo-pathologic examination confirm, say: congestion, necrosis and fatty degeneration of liver cells, alterations in HENLE's trabeculae. Nuclear inclusions (M. TORRES).

This result shows to evidence that the males, which had been for twelve days together with ten infected females, were also infected, for,

when injected to a *rhesus*, they determined in it a weakened disease, as was verified from the positive results of the inoculation of blood from *rhesus* 426 to *rhesus* 442.

EXPERIMENT 7. *M. rhesus* 483. This monkey was inoculated with an emulsion of 4 female *Aedes ægypti*, which were left together with male *Aedes* from the 10. 6, 29 to the 27. 6. 29, and were undoubtedly infected (4th experiment). (These male and female *Aedes* had been put on the 10. 6. 29 together into a clean cage and remained there until the 27. 6. 29). The monkey's temperature was 39o on the day of the inoculation; on the 29th, 39o.7; on the 30th, 39o; on the 1st July, 39o.9; on the 2nd and 3rd, 39o; on the 4th 39o.6; on the 5th 40o; on the 6th 40o.9, falling on the 7th to 36o, being then the animal killed. Macroscopical examination of the viscera confirmed the true aspect of yellow fever, and the histo-pathologic examination revealed: fatty degeneration, necrosis of the liver cells, alterations in HENLE's trabeculae, nuclear inclusions. (M. TORRES).

In our opinion, these experiments are a support to following facts:

1) it is posslble to infect male *Aedes ægypti* with disfibrinated blood from an infected *rhesus*;
2) it is possible to infect male *Aedes ægypti* by putting them together with infected females;
3) it is possible to infect female *Aedes ægypti* by putting them in contact with infected males;

These results seem to us to be the confirmation of a possible infection of mosquitoes, which under normal conditions, is probably not frequent, but which might perhaps account for the explanation of certain cases of yellow fever, which sometimes occur on a place, a long time after the last incidence, without having, during the time elapsed, any intermediate case been observed.

The seminal vesicles of the castrated mouse, test for the testicular hormones (1)

By THALES MARTINS, M. D., and A. ROCHA e SILVA

For some eight months past, we have been going into the question of tests for testicular hormones. Our object was chiefly to study the changes in seminal vesicles of white mice, as their atrophy after castration is a well known fact. (STEINACH (1)). We had in view determining which were the earliest changes found after gonadectomy; this being ascertained, the second part of our task was to investigate whether these changes might be reversible under the influence of injections of an active substance.

One may say that, as a rule, the atrophy of seminal vesicles in castrated mice easily allows, after 9 to 11 days, to detect a castrated from a normal mouse.

Normally the mucosa is covered with multiple villosities anastomosed in some spots. The cells are of the cylindrical type, the nucleus being situated at the basis of the cell.

The cytoplasm is rich in granulations. The lumen of the vesicle is filled with a viscous fluid, of milky appearance. We never found spermatozoids in the vesicles of normal white mice.

Five days after the castration, the morphologic changes are quite visible: reduction of the cytoplasm, nucleus in the centre of the cell.

The cytologic structure is modified; GOLGI apparatus, secretion granules. The cells assume a cuboidal shape, and the granulous aspect of the cytoplasm disappears, becoming homogenous. After a longer time, these changes become increasedly marked; the villosities lose their characteristic appearance and atrophy themselves.

The contents of the vesicles pass gradually to form a transparent fluid. The changes in the prostate, in the deferent canal and the penis do not present equal interest; therefore we leave them aside.

After having castrated more than 200 mice, of which we examined more than 115, we have come to the conclusion that the macroscopic sizes of the vesicles and cytological changes constitute a satisfactory test with regard to testicular hormones.

We are endeavouring to make it easier, by simplifying the histological technique, in order to get by means of dissociation or smearing, a ready verification of cytological changes, avoiding the long manipulation of inclusion, cuts, etc., of the material.

The best fixating mixtures are those that contain osmic acid.

(1) Received for publication July 31st, 1929.

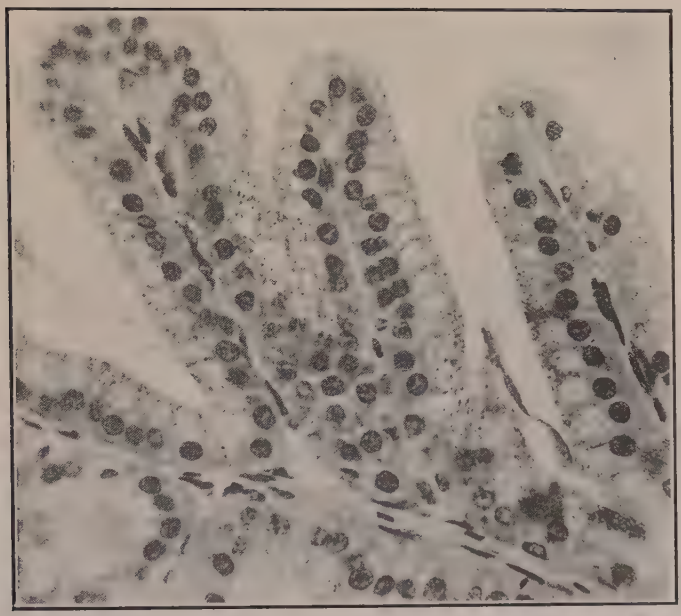


Fig. 1—Seminal vesicle of normal adult white mous. 1:600

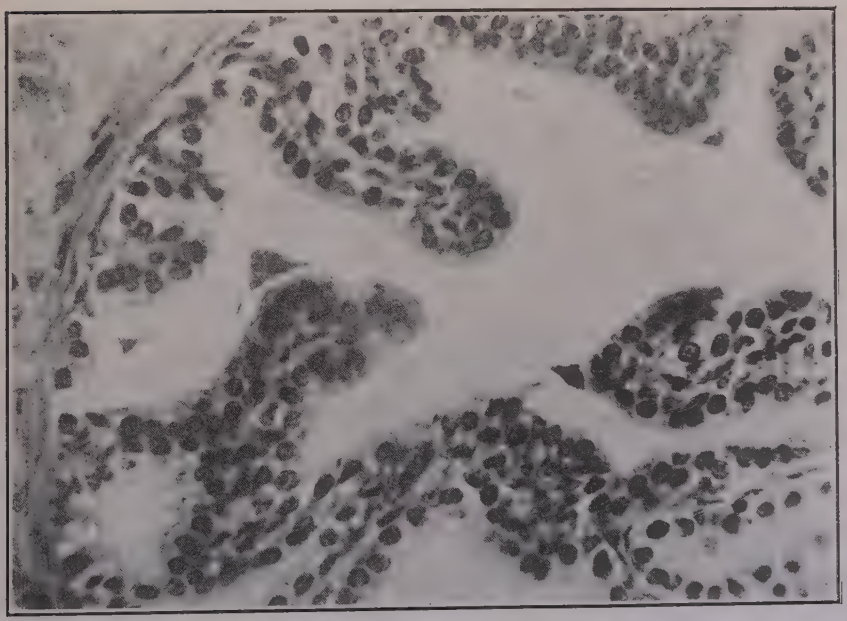


Fig. 2—Seminal vesicle of adult mous, 11 days after castration. 1:600

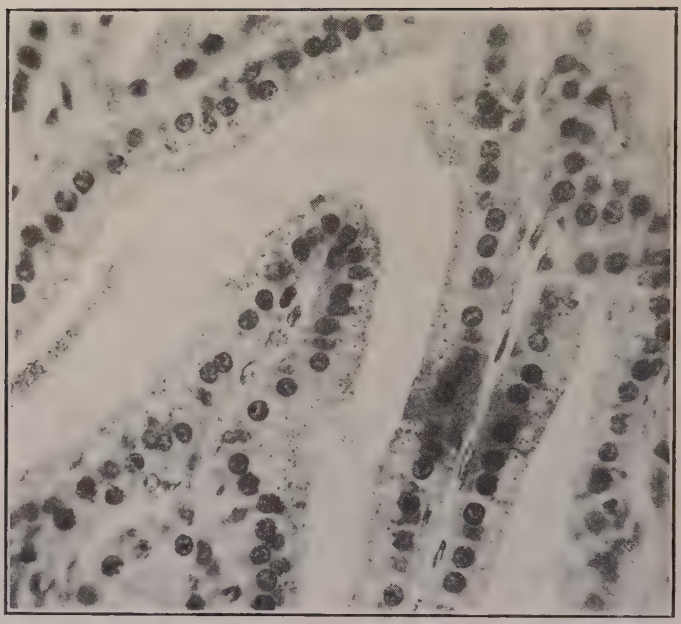
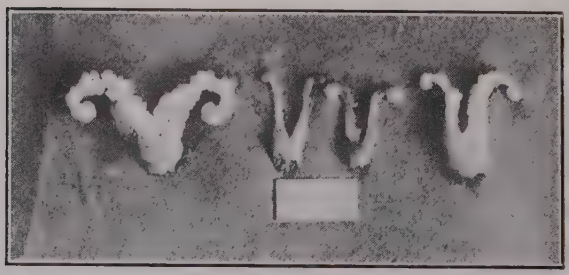


Fig. 3—Seminal vesicle of adult mous, 11 days after castration and injection of lipin extracts of goat testis. 1:600



1 2 3 4

Fig. 4—Vesicles of 17 grs. mice, same litter.

1—normal.
2 and 3 - 11 days after total castration.
4 - 11 days after castration, with conservation of the epididymis.

MEASURES

We note preferably the maximum length and width ; the product of both (L × H) gives an empirical number, which we shall admit to represent a size index, the same as Mc GEE (2) did for the capon comb. The weight is not so reliable an element. Numerous are the causes of errors. MUTO (3), who used to note the weight of associated glands as a guide for his researches on testicular hormones, reports most varying results.

Atrophy is more regular in still young specimens weighing 17 grams more or less. In such animals, we found, as a rule the length about 14 mm., and width 3,7 to 4,5 mm., and the index (L × H) 53 to 63).

In castrated animals, the vesicles, measured by the 10th to the 13th day after the operation, show an index in the vicinity of 20, not seldom under 10.

RESULTS OBTAINED BY INJECTION OF EXTRACTS.

These facts being established, we undertook then, to verify the influence of the injections of extracts. The injections were effected from the day immediate to castration, during a period of 5 to 10 days. One understands easily that the threshold to prevent atrophy taking place, should be lower than that necessary to regenerate an organ already in complete involution.

We used at the beginning suspensions or macerations of freshly extirpated testicles of mouse and rat. The results were not bright at all. Even when we injected subcutaneously to the animal, its own testis extirpated on the spot, the vesicles after 10 days were hardly distinguishable from the uninjected controls. We further injected testicular lipoids of bull and goat. We succeeded thus in obtaining unquestionable results: not only the cytoplasmic granulations were still richly prevailing, as also the size of the organ was, as an average, by 100 o/o higher than in controls.

With active extracts, we obtained index numbers up to 60, whilst the highest index for controls was 23, and together with this, the complete maintaining of the normal cytological appearance.

We may conclude that the intended test is quite satisfactory, and may be adopted, as long as no better one is proposed. Taking it as a basis, we shall admit as unit for testicular hormones (at least the hormone that has an influence on accessory glands), the smallest quantity which, when injected daily for a period of 10 days, keeps the seminal vesicles of the castrated white mouse at a level close to the normal, so as to keep the cellular characters of the gland unchanged, and to obtain for an index as described above, a number at least higher by twice than that found in the castrated controls of same weight and time of castration. This will prevent remaining within the limits of possible errors.

Of course, by further study, other details may be established, which will allow of an easily reaching a simple standard.

Ours is at least easier and quicker than the test of capon comb, chiefly used by Mc GEE, and of spermatozoid motility of MOORE (4) which seemed to be, up to now, the most reliable.

We presently used the test of seminal vesicles, not only in view of

the question of testicular extracts, but also for the study of other connected problems.

With implantations of the fore-lobe of the hypophysis of rabbit, effected twice a week, during a period of 2 to 3 months, in very young or normal adult mice, it is not possible to obtain in the animals, an index higher than the normal.

One may observe that they reach sizes and a structure rather approaching the maximum figures found in normal animals.

Also by a longlasting series of injections of hypophyseal extracts from pregnant women urine, the results are the same.

This is a coutribution to the study of the "law of all or nothing" as described by PEZARD (5), in fowl, and by LIPSCHÜTZ (6), in rodents.

Noteworthy is the fact that, when one or both epidydimides are left in the gonadectomized animals, the atrophy of the vesicles is delayed in many cases.

This does not happen in all cases, but is frequently observed. We understand it as representing a storage of testicular hormone, which is reabsorbed after the castration. It is obvious that care was taken, not to leave testicular fragments sticking to the epidydimis.

Our observations were ready for printing, when we received yesterday the "American Journal of Physiology" LXXXIX, N. 2, containing an article from MOORE and GALLAGHER "On the prevention of castration effects in Mammals by Testis Extract Injection".—These authors summarize in castrated rats, the cytological changes of seminal vesicles found after 5 to 20 days after the gonadectomy, as follows:

"We have found readily apparent cytological changes within 5 to twenty days after castration, involving regression of the secretory epithelium, loss of individual and constant elements of the cells of the normal tissue and changes in GOLGI bodies. On the basis of the cytology of the seminal vesicles, one can easily detect a ten days castrated animal; by injecting adult rats subcutaneously with testis extract, beginning immediately after operation, we have prevented the development of the typical castration changes in the seminal vesicles; animals castrated for twenty days, but uninjected, have both smaller seminal vesicles than they had at the time of operation".

"We have thus prevented the development of all the typical cytological castration changes by injection of the testis extract. Furthermore, we have produced, cytologically, normal seminal vesicles in animals that were prepubertally castrated and hence had not developed the typical normal vesicle until after being injected with the extract".

The mentioned abstracts are those connected with our own work. By reading it, we may not conclude from the mentioned work, which were the characteristics adopted for the test so as to establish a standard, viz.: age of animals, limit of duration of the injections, in the incidence of quantity to be used.

We believe mouse a most practical material for this kind of work. We preferred it, because the phenomena of regression appear earlier, and owing to its higher sensibility, being of a smaller weight, about one fifth lighter than the rat.

Some points of the present work will be further and more accurately developed in notes to be read at the next meeting of the Sociedade Brasileira de Biologia, and to be published in the Comptes Rendus de la Société de Biologie de Paris, and more extensively elsewhere.

The enclosed plates show examples of our own results.

It is a great pleasure to us that, independently of MOORE and GALLAGHER, we have been able to arrive, with mice, to results which, in general lines, are concordant with those obtained in rats by those eminent specialists.

Laboratory of Physiology, Oswaldo Cruz Institute.

Manguinhos, 30th July, 1929.

BIBLIOGRAPHY

1—STEINACH—Pflügus Arch., 56, 1894.
2—Mc GEE, JUHN and DOMM—Am. J. Phys., 87, 406.
3—MUTO—Act. med. Keijo, 11, 125, 1928.
4—MOORE—J. exp., zoology, 1, 455, 1928.
5—PEZARD—J. Physiol. Path., gen., 700, 1922.
6—LIPSCHÜTZ—The int. secret. of sex glands.

Homenagem á memoria de OSWALDO CRUZ

Com a presença da Exma. viuva OSWALDO CRUZ e filhos, do Ministro do Uruguay, Sr. RAMOS MONTERO, dos membros da delegação Uruguaya aos Congressos medicos commemorativos do 1º centenario da Academia Nacional de Medicina, da Caravana Medica Uruguaya, de innumeros congressistas sul-americanos, acompanhados de suas familias, e de todos os technicos do Instituto Oswaldo Cruz, foi inaugurada no dia 6 de Julho do corrente anno, no "hall" do 1º andar do edificio principal desse Instituto de Manguinhos, a placa de bronze que a Faculdade de Medicina de Montevidéo lhe offereceu, como uma homenagem á memoria de OSWALDO CRUZ.

Entregou a artistica dadiva o Sr. Professor JOSÉ LUIS SCOSERIA, Presidente da Delegação Medica Uruguaya, que proferiu o seguinte discurso:

"Señores".

La Facultad de Medicina do Montevidéo ha querido exteriorizar en fórma perdurable—en el bronce votado a la Gloria—la admiración y el respecto que la clase medica y todos los uruguayos sienten por el eminente sabio creador de este Instituto y nos ha confiado el alto honor de entregaros esa placa recordatoria que habeis tenido la gentileza de fijar en el muro de este augusto templo de la ciencia.

OSWALDO CRUZ libró a Rio de Janeiro del flajelo de la fiebre amarillia que hacia medio siglo era asolado por frecuentes empujes epidemicos que disimaban su población. En estas palabras se sintetiza generalmente la obra del saneamiento de Rio.

Recordemos las condiciones en que se efectuó.

Estabamos en el verano de 1903—dice ACEVEDO SODRÉ—pagando el tributo habitual al flajelo que nos enlutaba y humillaba, cuando el Presidente RODRIGUES ALVES confió la dirección general de los servicios de Salud Publica a OSWALDO CRUZ. Todos lo conociamos como un joven intelligente y aplicado a los estudios de laboratorio, que habia sido brillante su pasaje por la Facultad en al que conquistó la simpatia y el aprecio de sus maestros, que habia cursado con gran provecho las aulas del Instituto Pasteur, que habia publicado trabajos de valor en su especialidad, pero siempre fué tenido como modesto, circumspecto y aparentemente timido. Nadie lo creyó con las amplitudes necesarias para dirijir una gran campaña.

Aceptó el alto puesto que se le confiaba, formuló desde luego el plan de la lucha que iba a emprender, exijió de los poderes publicos amplia autonomia y los recursos necesarios y asumio el compromiso de extinguir la fiebre amarillia en pocos años.

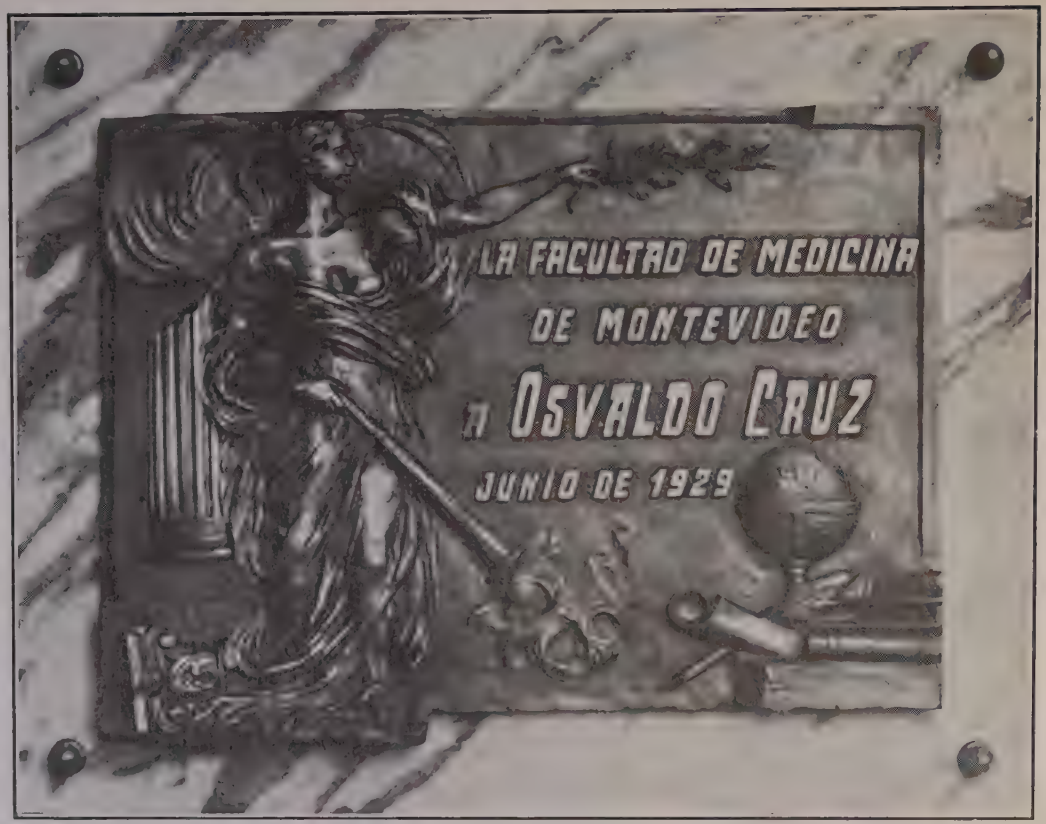

LA FACULTAD DE MEDICINA
DE MONTEVIDEO
A OSVALDO CRUZ
JUNIO DE 1929

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Figs. 1, 2 e 3—Differentes aspectos da inauguração da pedra fundamental do Monumento a OSWALDO CRUZ, na Avenida das Nações, Rio de Janeiro, em 5 de Julho de 1929.

De acuerdo con las idéas de FINLAY y siguiendo el ejemplo norte americano del saneamiento de la Habana, revolucionó las practicas hijienicas entonces corrientes, iniciando contra el mosquito la campaña antiamarillica. La nueva orientación dada a los servicios de Higiene Publica y la severidad con que eran aplicadas despertaron la mas violenta oposición; y tuvo que luchar no solo contra el mosquito sinó tambien contra peores enemigos: la ignorancia, los prejuicios, los intereses privados. Y la lucha fué formidable; la oposición revistió á veces fórmas de asonada y hasta llegó a peligrar su vida. Pocos eran los que lo defendian. La mofa, el escarnio, el desden, todas eran armas buenas para combatirle; su promesa de extinguir la fiebre amarillia en pocos años era calificada como una *fanfarronada de mozo audaz y inexperiente.*

Y aquel hombre de imperturbable energia que parecia timido, no se defendia, no recriminaba, no atacaba a sus detractores, no discutia, inculcaba su fé y su paciencia a sus auxiliares afirmando siempre que su respuesta seria la extincion de la fiebre amarilla que ya sentia cercana.

Ante esta oposicion implacable, ante esta lucha despiadada, OSVALDO CRUZ proseguia su obra con inquebrantable tenacidad, seguro del exito: la disminución progresiba de la fiebre amarilla sonaba como clarinada de victoria.

Permitidme señores, que termine estas palabras con un recuerdo personal que constituye una de las grandes emociones de mi vida.

El dia 3 de Agosto de 1909 presidia yo la seccion de Higiene del IV Congreso Medico Latino Americano que se celebraba en esta ciudad. OSVALDO CRUZ a quien yo no conoci hasta aquel momento tomo asiento frente a la mesa directiba con la timidez, con la modestia y la sensillez que eran sus mas salientes caracteristicas personales y dió lectura a una memoria tributada *Prophylaxia da Febre Amarella.*

Era la descripción de la campaña ante-amarillica iniciada el 20 de Abril de 1903 y que habia dado como resultado la extinción de aquella enfermedad; pues en el 1º semestre de 1908 solo se habiam producido 4 casos (1 en Marzo y 3 en Enero) habiendo por consiguinte transcurrido ya un año sin que se hubiera producido ningun caso nuevo. Era un triunfo, expuesto con la mayor sencillez, sin una frase que aludiera a la importancia del trecho y a sus transcendencias, sin una palabra ni alusion alguna de reproche á nadie. Asi era aquel Grande.

El Dr. LOZANO, delegado argentino, propuso un voto de aplauso y todos de pié aplaudimos largamente el triunfo de le ciencia, del sabio y del hombre superior.

Dos dias, despues, el 5 de Agosto en un dia radiante como el de hoy, tenia lugar en este mismo sitio, una cerimonia tocante.

Por iniciativa del Brasil Medico, la clase medica brasilera habia resuelto rendir publico y solenne homenage al eminente colega Dr. OSVALDO CRUZ por el relevante e inolvidable servicio prestado a la patria extinguiendo la fiebre amarilla de Rio de Janeiro.

A ese homenaje se adherieron todas las delegaciones de las republicas sud-americanas que habian concorrido al Congreso. Todos nos sentimos solidarios del homenaje, que fue un homenaje continental. En ese dia OSVALDO CRUZ cumplia 35 años y le fue entregada una medalla conmemorativa del acto.

El Dr. AZEVEDO SODRE hizo el elogio, del hombre, del sabio y de su incomparable elocuencia entregandole la medalla. Al terminar el discurso fueron incesantes y unisonos los aplausos y las aclamaciones al Doctor OSVALDO – como cariñosamente se le llamada—sobre cuya cabeza cayó durante algun tiempo una lluvia de petalas de flores arrojadas por todos los concurrentes, que lo rodeabamos. Todos los jefes de delegación tejimos elogios al homenajeado con mas o menos elocuencia, pero todos con igual sinceridad y entusiasmo.

OSVALDO CRUZ presa de grand emoción agradeció el homenaje haciendo extensivo a sus colaboradores, a quienes—con su habitual modestia—atribuyó la mayor parte de los exitos por el alcanzados.

En estas carillas no he pretendido hacer la biografia de OSVALDO CRUZ. Ella está escrita con profundos rasgos en la historia cientifica del Brasil y todos en el Brasil y en la America la conocen. Solo me he referido a su obra mas proficua a la que mayor muestra sus grandes virtudes y condiciones de hombre de ciencia y de patriota, la que lo senala al respeto y a la admiración de la humanidad.

Asi era el hombre que fundó, creó y organizó este Instituto, verdadera usina cientifica de donde ya han salido miles de memorias y estudios sobre los mas arduos y complejos problemas de las ciencias biologicas.

Los grandes hombres, los benefactores de la humanidad, no mueren, viven en sus obras y este Instituto que con toda justicia lleva el nombre de OSVALDO CRUZ es el mas digno y el mas grande monumento a su memoria; aqui perduran sus enseñanzas y el recuerdo que consagra será siempre estimulo y fuente de energias, para la actual y las futuras generaciones de trabajadores que alli andan en busca de enseñanzas, por eso la Facultad de Medicina de Montevidéo quiere que en el figure en forma indeleble el homenaje que reverentemente tributa al sabio, al patriota al grande OSVALDO CRUZ, gloria del Brasil y del a America Latina".

O Director, interino, do Instituto, Dr. ALCIDES GODOY, agradecendo a distincta e carinhosa homenagem, proferiu as seguintes palavras:

"Srs. Delegados do Uruguay.—Meus senhores.—Mais uma vez manifestaes, de modo tão grato para nós, a vossa admiração por OSWALDO CRUZ; assim sois constantes em vossa amisade o que muito vos dignifica.

Sois justos para com os desapparecidos, o que é tão raro, mais que dos vivos vos lembraes dos mortos, e que tanto vos exalta.

Somos felizes por ter tido desde sua fundação neste Instituto, uma só norma. Tão elevado foi o padrão deixado por OSWALDO CRUZ, que a unica e grande difficuldade é de conserval-o, não desmerecendo as tradições herdadas.

Este Instituto com as lembranças que tendes delle, e com a vossa bondade, outra cousa não quereis senão mais uma vez manifestal-as, guarnecendo-o com as obras de arte que nos offereceis, fica de qualquer modo sendo integrado ao vosso paiz e a placa que inauguramos é uma representação material dos laços espirituaes que já nos uniam.

OSWALDO CRUZ foi na Sul-America um precursor, criando, a cellula mater de instituições congeneres a esta, que tanto honram a mentalidade dos latino-americanos, e no momento actual não vemos senão a grandeza de

vosso reconhecimento que reflecte a maior elevação de vosso espirito e coração.

Terminando senhores, eu desejaria que ao mesmo tempo que inauguramos esta placa, voltemos ao passado e, num esforço de imaginação para vós outros e de emoção para nós, vejamos não os bronzes ou os marmores, nem o busto de OSWALDO CRUZ que ali está sobre um pedestal de granito representar a realidade, mas sobre as pedras que formam hoje a base deste Instituto, outrora rusticas e esparsas por este mesmo local, invoquemos a figura de OSWALDO CRUZ em descanço após fatigante jornada; essa figura, tão familiar a todos, contemplaria o horizonte desapparecendo em um rapido crepusculo tropical, o semblante tranquillo, os olhos de quem accordando sonha, respirando em um mundo de esperanças. . . e depois a noite. . .

Noite que nos envolve e a qual quereis com a vossa amisade tornar menos escura, trazendo a claridade de vossa solidariedade, que symbolizaes nesta recordação.

Falou tambem um membro da Caravana Medica Uruguaya, sendo todos os discursos muito applaudidos pela selecta assistencia.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.